

Die Wirkung des Knochenmorphogenesefaktors BMP-2 auf die Migration und Invasion von Mammakarzinomzellen

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Annette Katharina Geyer,
geboren am 09. Mai 1977 in Göttingen

Dezember 2005

Gutachter 1: Prof. Dr. K. Höffken

Gutachter 2: Prof. Dr. St. Wölfl

Gutachter 3: Prof. Dr. B. Wiederanders

Tag der öffentlichen Verteidigung: 05. Dezember 2006

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

BMP	-	bone morphogenetic protein = Knochenmorphogenesefaktor
bp	-	Basenpaare
BRCA	-	breast cancer gene
CTGF	-	connective tissue growth factor - Wachstumsfaktor
cDNA	-	complementary DNA
dATP	-	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	-	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	-	Desoxyguanintriphosphat
DMEM	-	Dulbecco's Modified Eagle Medium zur Zellkultivierung
DNA	-	desoxyribo nucleic acid = Desoxyribonukleinsäure (DNS)
dNTP	-	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	-	Dithiotreitol
dTTP	-	Desoxythymidintriphosphat
EGF	-	epidermal growth factor - Wachstumsfaktor
EDTA	-	ethylene diamine tetraacetic acid = Äthylendiamintetraessigsäure
FCS	-	fetal calf serum = fötales Kälberserum
FGF	-	fibroblast growth factor - Wachstumsfaktor
GAPDH	-	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
kDa	-	Kilo-Dalton
MMP	-	Matrix MetalloProteinase
mRNA	-	messenger RNA
NIH 3 T 3	-	Maus-Fibroblasten-Zelllinie
PAI-1	-	Plasminogenaktivator-Inhibitor
PBS	-	Phosphate Buffered Saline
PCR	-	polymerase chain reaction = Polymerasekettenreaktion
PVDF	-	Polyvinylidenfluorid - Membran
RB 1	-	Retinoblastomgen 1
rhBMP	-	rekombinantes humanes BMP
RNA	-	ribonucleic acid = Ribonukleinsäure (RNS)

RPMI	-	Roswell Park Memorial Institute – Medium zur Zellkultivierung
RT	-	Reverse Transkriptase
SF	-	serumfrei
SMAD	-	homologes Gen zu Mad (Drosophila) und Sma (Caenorhabditis elegans) in Vertebraten
TGF	-	transforming growth factor - Wachstumsfaktor
TIMP	-	tissue inhibitor of metalloproteinases
TNM	-	Klassifikation zur Stadieneinteilung maligner Tumoren
uPA	-	Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp
VEGF	-	vascular endothelial growth factor - Wachstumsfaktor

INHALTSVERZEICHNIS

1. ZUSAMMENFASSUNG.....	1
2. EINLEITUNG.....	2
2.1 Mammakarzinom	2
2.1.1 Definition.....	2
2.1.2 Epidemiologie.....	2
2.1.3 Ätiologie	3
2.1.4 Biologie	4
2.1.5 Pathogenese	5
2.1.6 Histologie	7
2.1.7 Klinik	7
2.2 Knochenmorphogenesefaktoren.....	9
2.2.1 Definition.....	9
2.2.2 Struktur	9
2.2.3 Signaltransduktion	11
2.2.4 Biologische Funktionen.....	14
2.2.5 Expression in Tumoren.....	15
2.2.6 Klinische Bedeutung	16
2.3 Ziel der Arbeit.....	17
3. MATERIAL UND METHODEN.....	18
3.1 Zellkultur.....	18
3.1.1 Zelllinien.....	18
3.1.2 Aufbereitung der Zellen.....	18
3.1.3 Bestimmung der Zellzahl	19
3.1.4 Zellkulturüberstände.....	19
3.2 Migrationsassay	19
3.2.1 Vorbereitung der Zellen.....	19
3.2.2 Versuchsaufbau	20
3.2.3 Auswertung.....	20

3.3 Invasionsassay	20
3.3.1 Vorbereitung der Zellen und Inkubation	21
3.3.2 Versuchsaufbau	21
3.3.3 Auswertung.....	21
3.4 RNA-Isolierung.....	22
3.4.1 Vorbereitung der Zellen.....	22
3.4.2 Isolierung der Gesamt-RNA.....	22
3.4.3 RNA-Messung	23
3.5 cDNA-Synthese	24
3.6 Proteasen-cDNA-Microarray	25
3.6.1 Vorbereitung.....	25
3.6.2 Digoxigenin-Labeling während der reversen Transkription	25
3.6.3 Fällung der Sonde	26
3.6.4 Prähybridisierung	26
3.6.5 Hybridisierung	26
3.6.6 Waschen der Membran.....	27
3.6.7 Entwickeln der Membran	28
3.6.8 Detektion	28
3.6.9 Auswertung.....	29
3.7 PCR.....	29
3.7.1 RT-PCR	29
3.7.2 PCR-Analyse	31
3.8 Statistische Auswertung.....	32
4. ERGEBNISSE.....	33
4.1 Migrationsversuche	33
4.2 Invasionsversuche.....	36
4.3 c-DNA-Microarray	42
4.4 PCR-Daten	54
5. DISKUSSION	62
6. SCHLUSSFOLGERUNGEN.....	77

7. LITERATURVERZEICHNIS	78
8. ANHANG	I
8.1 Tabellen	I
8.2 Veröffentlichungen	XII
8.3 Danksagung.....	XIV
8.4 Lebenslauf	XV
8.5 Eidesstattliche Erklärung	XVII

1. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion des Knochenmorphogenesefaktors BMP-2 hinsichtlich der Invasion und Migration von Mammakarzinomzellen als molekularbiologisches Äquivalent der klinischen Tumorprogression bzw. Metastasierung zu erforschen.

Anhand von *in-vitro* Transwell- und Boyden-Chamber-Assays konnte eine erhöhte Migrationsfähigkeit und Invasivität der Brustkrebszelllinien BT-20, BT-474, T-47-D und MCF-7 unter Einfluß von exogen zugeführtem, rekombinantem BMP-2 gezeigt werden. Die Ausnahme machte SK-BR-3, weshalb diese Zelllinie und die Hypothese eines antagonistisch zu BMP-2 wirkenden Faktors, eventuell BMP-3, Bestandteil weiterführender Untersuchungen in unserem Labor sind.

Funktioneller Hintergrund der gesteigerten Aggressivität von Tumorzellen ist u.a. ein verändertes Gleichgewicht zwischen Proteasen und Proteaseinhibitoren in der Extrazellulärmatrix. Wir konnten mit dem Proteasen-cDNA-Microarray Hinweise darauf finden, dass auch BMP-2 über eine Dysregulation der Genexpression von verschiedenen Proteasen wirkt. Die Inkubation der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 mit BMP-2 zeigte eine Herunterregulation von Cathepsin B, D, H und K, Caspase 7 und Integrin β 5 und eine Hochregulation von Integrin β 4. Die korrespondierenden Proteaseinhibitoren Cystatin A und C fanden wir nicht verändert.

Um eine unabhängige Bestätigung dieser Ergebnisse zu erhalten, wurden die MCF-7 Zellen wieder mit BMP-2 behandelt und die Expression der oben genannten Gene wurde durch semi-quantitative PCR untersucht. Dabei fanden wir reproduzierbare Regulationen der Genexpression für Cathepsin D, H und K sowie für Integrin β 4.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Mammakarzinomzellen unter Einfluß von BMP-2 unter anderem wahrscheinlich durch Dysregulation einiger Proteasen stärker migrieren und invasiver sind. Bevor diese Veränderungen jedoch für diagnostische, prognostische oder therapeutische Zwecke genutzt werden können, müssen weitere Untersuchungen der Genexpression, Aktivität und Funktion der einzelnen Faktoren sowie ihres Zusammenspiels unternommen werden.

2. EINLEITUNG

2.1 Mammakarzinom

2.1.1 Definition

Mammakarzinome sind maligne Proliferationen des Drüsengewebes der Brust.

2.1.2 Epidemiologie

Mammakarzinome stellen die häufigste maligne Erkrankung der Frau dar und sind in der Altersgruppe der 35- bis 55-jährigen Frauen (westliche Welt) die häufigste Todesursache.

Etwa jede 10. Frau wird im Laufe ihres Lebens ein Mammakarzinom entwickeln. Die Inzidenz dieser Erkrankung hat in den letzten 40 Jahren stetig zugenommen (ca. 4% pro Jahr in den 1980ern). Jedoch haben sich die Inzidenzraten für Brustkrebs bei Frauen in den 1990ern eingependelt auf etwa 110 Neuerkrankungen pro 100.000 Frauen pro Jahr. Einige Experten glauben, daß die frühere graduelle Steigerung der Inzidenz durch den häufigeren und systematischeren Einsatz der Mammographie als Screeningmethode und die lead-time bias assoziiert mit der früheren Diagnose erklärt werden kann (Parker et Tomaselli, 1996; Parkin et al., 1999).

Die Wahrscheinlichkeit an Brustkrebs zu erkranken nimmt mit steigendem Alter zu. Es sind aber auch zunehmend junge Frauen betroffen.

Die Mortalitätsrate war im Grunde genommen stabil von 1950 bis 1989. Ein signifikanter Rückgang der Mortalitätsraten konnte erst in den 1990ern verzeichnet werden, mit der größten Abnahme bei jungen Frauen (Wingo et al., 1998; Wingo et al., 1999). Diese Verbesserungen sind wahrscheinlich Resultat einer früheren Detektion und verbesserter Therapien.

2.1.3 Ätiologie

Die Ätiologie des Mammakarzinoms ist unbekannt. Allerdings gibt es diverse Risikofaktoren, die bei der Entstehung eine Rolle spielen. Die auffälligsten dieser Faktoren sind Geschlecht und Alter.

Brustkrebs ist 100 bis 200 mal häufiger bei Frauen als bei Männern. Ein Verhältnis, das auf der ganzen Welt ziemlich konstant ist.

Es ist offensichtlich, daß die Inzidenz von Brustkrebs im Alter dramatisch ansteigt. Sie reicht von unter 10 Fällen pro 100.000 Frauen im Alter von 20 bis 30 Jahren bis zu über 300 Fällen pro 100.000 Frauen über 60 Jahre (Colditz et al., 1993; Henderson, 1993). Der Mittelwert des Alters bei Diagnosestellung beträgt in Deutschland 64 Jahre.

Weitere Risikofaktoren sind:

- Sozioökonomische Klasse: Es besteht ein häufigeres Vorkommen in höheren sozialen Klassen und bei höherem Bildungsstatus.
- Ethnische Gruppe: Asiatisch-pazifische Gruppen haben eine niedrige Inzidenz, nordeuropäische Gruppen die höchste Inzidenz für Brustkrebs.
- Familiärer Hintergrund / Genetik: Etwa 12% der Frauen mit Brustkrebs haben ein oder mehr Verwandte ersten Grades mit Brustkrebs (Familial Breast Cancer, 2001). Ca. 4 bis 9% haben hereditäre Karzinome (Lynch und Lynch, 1986; Newman et al., 1988). Dabei werden vererbte Mutationen besonders der Gene BRCA-1 und BRCA-2 mit der familiären Häufung von Mamma- und Ovarialkarzinomen in Verbindung gebracht.
- Endokrine und reproduktive Risikofaktoren: Viele Studien deuten auf einen Zusammenhang zwischen dem weiblichen Hormon Östrogen und der Entstehung von Brustkrebs hin. Zum Beispiel reduziert die operative Entfernung der Ovarien dramatisch das Brustkrebsrisiko (MacMahon et al., 1973). Frühe Menarche sowie späte Menopause erhöhen das Risiko (Henderson et al., 1985). Auch hohes Alter bei ausgetragener Erstschwangerschaft sowie Nulliparität sind risikosteigernd (MacMahon et al., 1973). Weniger anerkannt sind Risikofaktoren wie Anzahl der Schwangerschaften, Laktation und spontane oder induzierte Aborte (Kelsey und Berkowitz, 1988; Kelsey und Gammon, 1991).

- Exogene Hormone: Eine länger als fünf Jahre andauernde Hormonsubstitution führt zu einem moderaten Anstieg des Mammakarzinomrisikos. Das Risiko scheint mit zunehmender Einnahmedauer anzusteigen, ist wohl dosisabhängig und sinkt nach dem Absetzen der Hormone wieder ab (Breast Cancer and Hormone Replacement Therapy, 1997).
- Ernährung: Fleisch- und fettreiche Ernährung sollen die Karzinogenese fördern. Postmenopausales Übergewicht ist ebenfalls ein Risikofaktor. Auch Alkoholkonsum erhöht das Brustkrebsrisiko (Hiatt und Bawol, 1984).
- Ionisierende Strahlen: Strahlenexposition ist ein bekannter Risikofaktor der Krebsentstehung (MacMahon et al., 1973; Land, 1995). Darunter fallen allerdings nicht die diagnostischen Röntgenprozeduren (Boice Jr et al., 1995). Aber die Inzidenz von Brustkrebs ist zum Beispiel nach erhaltener Radiotherapie mit der Manteltechnik bei Morbus Hodgkin erhöht (Bhatia et al., 1996; Goss und Sierra, 1998).

Außerdem gibt es weitere Faktoren, die das Brustkrebsrisiko erhöhen (Hulka und Stark, 1995; Lipworth, 1995).

2.1.4 Biologie

Die Brustdrüse der geschlechtsreifen Frau besteht aus tubulären verzweigten Einzeldrüsen, die in ein fibröses Stroma eingebettet sind und den Fettgewebeskörper septenartig unterteilen.

Brustwachstum und -entwicklung unterliegen der Kontrolle vieler Hormone und Wachstumsfaktoren. Zu diesen Hormonen gehören Östrogene, Progesterone, Androgene, Glukokortikoide, Prolaktin, Schilddrüsenhormone, Insulin, IGF-1 und IGF-2, FGF, EGF und TGF- α (Dickson und Lippman, 1988). Die Effekte werden durch spezifische Rezeptorbindung getriggert, was eine Kaskade von intrazellulären biochemischen Signalen in Gang setzt und die Aktivierung bzw. Repression verschiedenster Gene zur Folge hat.

Da normales Brustgewebe durch diese Hormone und ihre Rezeptoren reguliert wird, ist es nicht verwunderlich, daß auch maligne Zellen, die von der Brustdrüse ausgehen,

ebenfalls diese Rezeptoren ausbilden und eine gewisse hormonelle Abhängigkeit besitzen. Genetische Aberrationen u.a. der Signalwege von Wachstumsfaktoren sind mit einer Reihe von Entwicklungsabnormitäten und chronischen Krankheiten, darunter auch Krebs, verknüpft.

2.1.5 Pathogenese

Die fundamentale Abnormität der Entwicklung von Krebs ist die kontinuierliche unregulierte Proliferation von Tumorzellen. Ein entscheidender Unterschied zwischen normalen und Tumorzellen ist dabei die fehlende Kontaktinhibition. Andere Charakteristiken von Tumorzellen sind defekte Differenzierung sowie der Verlust der Fähigkeit zur Apoptose, dem programmierten Zelltod.

Auf zellulärer Ebene wird die Entstehung von Tumoren als mehrschrittiger Prozess angesehen, der Mutation und Selektion von Zellen mit ansteigender Kapazität für Proliferation, Überleben, Invasion und Metastasierung involviert.

Invasion und Metastasierung sind die heimtückischsten und lebensbedrohlichsten Aspekte von Krebs (Liotta und Stetler-Stevenson, 1991; Duffy, 1992; Kohn und Liotta, 1995).

Am Anfang steht dabei die Tumorzellmigration, d.h. die Bewegung von Zellen im Organismus, die notwendig für die Initiation der metastatischen Kaskade ist. Die Zellen verlassen den Ursprungsort und bekommen Zugang zum Blutkreislauf. Um die Vorwärtsbewegung zu erreichen, koppeln die Zellen lokale Proteolyse mit koordinierter und zeitlich limitierter Adhäsion und Deadhäsion. Dabei reagieren Tumorzellen auf eine Reihe von Agentien, einschließlich der Motilitäts- und Wachstumsfaktoren der Wirtszelle, Komponenten aus der extrazellulären Matrix und Faktoren, welche die Tumorzellen selbst produzieren (Liotta et al., 1986; Aznavoorian et al., 1990; Rong et al., 1994). Neben Wachstum und Motilität fördern diese Faktoren auch die Angiogenese, d.h. die Bildung von neuen Blutgefäßen, was sowohl Tumorwachstum als auch Metastasierung unterstützt. Weiterhin sezernieren maligne Zellen generell Proteasen, die extrazelluläre Matrixkomponenten verdauen und die Invasion in angrenzende Gewebe ermöglichen.

Das metastatische Potential ist also beeinflusst durch die lokale Mikroumwelt, die Angiogenese, Stroma-Tumor-Wechselwirkungen und die Elaboration von Zytokinen durch das lokale Gewebe bzw. noch signifikanter durch seinen molekularen Phänotyp, welcher eine Kulmination von genetischen Veränderungen darstellt.

Solche zellulären Transformationen treten durch die Aktivierung von Onkogenen, Verlust oder Mutation von Tumorsuppressorgenen oder beidem auf (Bishop, 1985; Bishop, 1991).

Die physiologische Rolle der Onkogene ist in der Wachstumsregulation von normalen Zellen zu finden. Veränderungen der Onkogene sind assoziiert mit der Initiation, Promotion, und / oder Erhaltung von Tumoren. Produkte von Onkogenen sind häufig Wachstumsfaktoren oder Wachstumsfaktorrezeptoren. Onkogene, die in Brustkrebsgewebe exprimiert werden, sind z.B. Mitglieder der myc und ras Familie, int-2 und Mitglieder der EGF-Rezeptorfamilie, einschließlich HER2, HER3 und HER4. Überexpression von Wachstumsfaktorrezeptoren führt häufig zur konsekutiven Aktivierung dieser Rezeptoren. So werden kontinuierlich Wachstumssignale ins Zellinnere geleitet, was die Aktivierung von multiplen intrazellulären Signalwegen und unreguliertes Zellwachstum zur Folge hat.

Tumorsuppressorgene spielen eine Rolle bei der Karzinogenese durch Verlust der normalen „Suppressor“-Funktion durch Mutationen oder Deletion. Veränderungen im Retinoblastomgen (RB1) und dem humanen P53 wurden beim Mammakarzinom identifiziert. Auch die zwei Gene, die mit hereditärem Brustkrebs assoziiert sind, BRCA1 und BRCA2, sind unter normalen Bedingungen Tumorsuppressorgene. Die Funktion der Proteinprodukte dieser Gene besteht in der Kontrolle der Zellproliferation (RB1 und P53) oder der DNA-Reparatur (P53, BRCA1, BRCA2). Mutationen führen dann zu dysreguliertem Zellzyklus und letztendlich Krebs.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß sich das Mammakarzinom also mehrphasisch über verschiedene zelluläre Zwischenstufen und biologische Stadien und vermutlich mehrjähriger Latenz zu einem infiltrierenden Karzinom entwickelt.

2.1.6 Histologie

Histologisch unterscheidet man duktile und lobuläre Karzinome. 85 - 90% der Mammakarzinome gehen vom Epithel der Ductus oder der terminalen Ductuli aus. 10 - 15% entwickeln sich aus dem Epithel der Lobuli .

Man differenziert zwischen invasiven (95% der Fälle) und nichtinvasiven (ca. 5% der Fälle) Karzinomen.

Weiterhin unterscheidet man drei verschiedene Malignitätsgrade je nach histologischer Differenzierung, Kernpleomorphie und Mitosenzahl.

2.1.7 Klinik

Das Mammakarzinom findet sich am häufigsten im oberen äußeren Quadranten der Brust (55%).

Die Metastasierung, d.h. die Absiedlung von Zellen oder Zellverbänden in primär nicht erkrankte Körperregionen, kann bereits früh erfolgen, je nach histomorphologischer und biologischer Charakteristik des Karzinoms. Sie erfolgt zunächst in die regionalen Lymphknoten, dann hämatogen. Bevorzugte Organe der hämatogenen Metastasierung sind Skelettsystem, Pleura, Lunge, Leber und Gehirn.

Die Diagnostik erstreckt sich von Anamnese und klinischer Untersuchung über Ultraschall und Mammographie bis hin zur Zytologie.

Für die Therapieentscheidung wegweisend ist die Stadieneinteilung des Mammakarzinoms. Diese erfolgt nach dem TNM-System, das im folgenden kurz dargestellt ist (Tab.1).

Tis	in situ
T1	< 2 cm
T1mic	< 0,1 cm
T1a	> 0,1 - 0,5 cm
T1b	> 0,5 - 1 cm
T1c	> 1 - 2 cm
T2	> 2 - 5 cm
T3	> 5 cm
T4	Brustwand / Haut
T4a	Brustwand
T4b	Hautödem, Ulzeration, Satellitenknötchen
T4c	4a und 4b
T4d	Entzündliches Karzinom

N1	Beweglich axillär
N2a	Fixiert axillär
N2b	A. mammaria interna
N3a	Infraklavikulär
N3b	Axillär u. A. mamm. int.
N3c	Supraklavikulär

M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tab.1: TNM-Klassifikation des Mamma-karzinoms.
T: Tumor, N: Nodulus (Lymphknoten), M: Metastase.

Die Therapierichtlinien empfehlen bei Abwesenheit von Fernmetastasen (M0) eine definitive Primäroperation. Diese wird als brusterhaltende Therapie durchgeführt. Nur bei Kontraindikationen, wie z.B. zu kleine Brust oder ungünstiger Sitz des Tumors, erfolgt heute noch eine Mastektomie. Außerdem gehört die Lymphonodektomie bei beiden chirurgischen Techniken obligat zum diagnostischen und therapeutischen Konzept.

Je nach Risikoeinstufung erfolgt dann eine adjuvante Therapie. Dabei unterscheidet man die postoperative Bestrahlung und die systemische Therapie mittels Hormonen oder Zytostatika.

Beim metastasierten Mammakarzinom steht die palliative Therapie im Vordergrund, die sich ebenfalls operativer, radiologischer und hormon- bzw. chemotherapeutischer Mittel bedient.

Nach erfolgreicher Primärtherapie setzt unmittelbar die Nachsorge der Patientinnen ein, die neben medizinischen Kontrollen auch psychosoziale Betreuung beinhaltet.

2.2 Knochenmorphogenesefaktoren

2.2.1 Definition

Der Name bone morphogenetic protein (BMP) beschreibt eine Gruppe von Proteinen, die ursprünglich durch ihre Knochen und Knorpel induzierende Aktivität außerhalb des skeletalen Bereichs definiert wurden (Urist, 1965).

Die Klonierung der cDNA zeigte, daß die BMPs Mitglieder der TGF- β -Superfamilie sind (Wozney et al., 1988). Die TGF- β -Superfamilie ist eine Gruppe multifunktionaler Zytokine, die eine wichtige Rolle bei der embryonalen Entwicklung und der Kontrolle von Differenzierung und Proliferation spielen.

Die Subfamilie der BMPs besteht aus ca. 30 verschiedenen Mitgliedern (Ducy und Karsenty, 2000), welche an der Regulation der verschiedensten biologischen Prozesse, wie z.B. Proliferation, Differenzierung, Apoptose, Morphogenese und Embryonalentwicklung beteiligt sind.

2.2.2 Struktur

Der Aufbau der Proteine der TGF- β -Superfamilie ist bei allen Mitgliedern sehr ähnlich. Sie werden als Präpropeptide synthetisiert, die ungefähr drei Mal so lang sind wie die mature Domäne (Jones et al., 1994). Jedes Protein besitzt eine N-terminale Signalsequenz, mit deren Hilfe es an die Zelloberfläche gelangt. Dort verbleibt es in der Extrazellulärmatrix. Des Weiteren besitzt es eine Prodomäne und eine mature Domäne

am Carboxy-terminalen Ende. Solange die Prodomäne nicht abgespalten ist, ist diese noch inaktiv. Erst durch die proteolytische Abspaltung der Prodomäne werden die Proteine aktiv (Hogan, 1996). Das Hauptstrukturmerkmal der TGF- β -Proteine ist ein hoch konserviertes Motiv aus 7 Cysteinresten im reifen Protein (Abb.1).

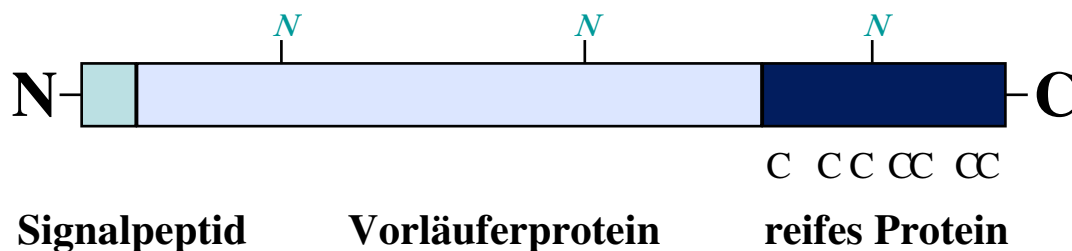


Abb.1: Struktur der Proteine der TGF- β -Superfamilie.

N: N-terminales Ende. **C:** C-terminales Ende. **G:** N-Glykolsyl-Rest.

Im folgenden werde ich mich auf die Beschreibung von BMP-2 beschränken.

BMP-2 ist ein Glykoprotein, welches als Propeptid synthetisiert wird und nach Glykosylierung, proteolytischer Spaltung und Dimerisierung seine mature, homodimere Form erlangt.

Wie zu erwarten, hat BMP-2 die gleiche Faltpopologie wie die TGF- β -Superfamilie. Die typischen Kennzeichen dieser Proteine sind zwei separate antiparallele β -Faltblätter, von denen das zweite eine gedrehte und überkreuzte Konformation übernimmt, und eine vierfach gedrehte α -Helix, welche ungefähr senkrecht zu den β -Strängen verläuft. Die gesamte Form der Faltstruktur wurde beschrieben als eine Hand (Daopin et al., 1992), bei der die Helix das Gelenk, der Zystinkern die Handfläche und die β -Faltblätter die Finger darstellen (Abb.2).

Es gibt aber auch klare Unterschiede in einigen strukturellen Elementen zwischen den TGF- β s und den BMPs. Zum Beispiel ist der N-Terminus von BMP-2 wegen der Unordnung in der Elektronendichte nicht sichtbar. Außerdem enthält BMP-2 nicht die kurze $\alpha 2$ -Helix, die in TGF- β s nach dem zweiten β -Strang beobachtet werden kann. Dies ist bedingt durch eine Aminosäuredeletion, welche in einer engeren non- α -helikalen Drehung resultiert (Scheufler et al., 1999).

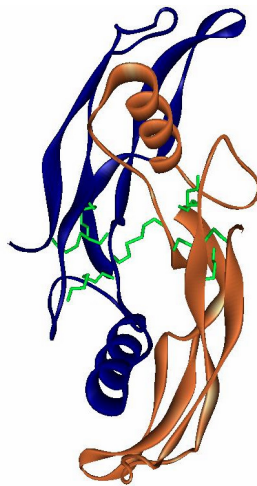


Abb. 2: Struktur von BMP-2
(Scheufler et al., 1999)

Wie oben beschrieben ist natives BMP-2 ein Homodimer, dessen Untereinheiten in einer doppelt gefalteten Achse verbunden sind. Da die Monomere nicht in einer geraden Linie angeordnet sind, sondern in einem Winkel von etwa 40° , verursacht die Dimerisierung eine konvexe und eine konkave Seite des Moleküls. Das schafft eine Kernregion aus Zystinknoten und β -Faltblättern, die, gehalten durch hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen, einen eher hydrophilen Charakter hat. Die lösungszugängliche Oberfläche von BMP-2 legt daher große hydrophobe Areale frei. Dadurch wird auch klar, warum BMP-2 so ungewöhnliche Lösungsseigenschaften hat und zu Aggregation tendiert (Ruppert et al., 1996).

Während BMP-2 in den meisten Fällen als Homodimer biologisch aktiv ist, werden zunehmend Heterodimere in der Literatur beschrieben, die funktionell den Homodimeren in ihrer biologischen Aktivität überlegen sein sollen (Hogan, 1996; Miyazono et al., 2001).

2.2.3 Signaltransduktion

BMPs übermitteln Signale in die Zelle durch Bindung und Oligomerisierung von zwei Typen von Rezeptormolekülen (Reddi, 1997).

Die Rezeptoren, Typ 1 und Typ 2, sind strukturell sehr ähnlich und bestehen aus kurzen zystinreichen extrazellulären Domänen, einfachen transmembranen Regionen und intrazellulären Serin-Threonin-Domänen (Kingsley, 1994; Massague et al., 1994).

Studien über die Rezeptoren für TGF- β s haben ein Modell für die Aktivierung dieser Serin-Threoninkinase-Rezeptorkomplexe ergeben (Wrana et al., 1994). Zuerst bindet der Ligand an den Typ 2 Rezeptor, der in der Zellmembran in einer oligomeren Form mit aktivierter Kinase vorkommt. Dann wird der Typ 1 Rezeptor, der alleine TGF- β schlecht binden kann, zu dem Komplex hinzugezogen. Der Typ 2 Rezeptor phosphoryliert den Typ 1 Rezeptor, um ihn zu aktivieren. Das Entstehen dieses heterodimeren Rezeptorkomplexes ist durch die Bindung des Liganden zwar ausgelöst, aber der Komplex wird auch von direkten Wechselwirkungen zwischen den zytoplasmatischen Teilen der Rezeptoren stabilisiert.

Für BMPs ist dies ähnlich. Sie binden mit niedriger Affinität an die einzelnen Rezeptortypen, aber mit hoher Affinität, wenn die zwei Rezeptoren gleichzeitig anwesend sind (Liu et al., 1995). Im Gegensatz zu TGF- β wird bei der Rezeptorbindung der BMPs allerdings zuerst der Typ 1 und dann der Typ 2 Rezeptor gebunden.

Aufgrund seiner homodimeren Struktur werden je 2 Rezeptormoleküle Typ 1 und Typ 2 benötigt. Transphosphorylierung des Typ 1 Rezeptors durch die Typ 2 Kinase an einer spezifischen Region, dem GS-Bezirk, der zytoplasmatischen Domäne löst dann die weiterführende Signalkaskade aus. Diese führt über verschiedene zytoplasmatische Mediatoren zur transkriptionalen Antwort bei den Zielgenen.

Als zytoplasmatische Mediatoren wurden die sogenannten SMADs identifiziert. Das sind Moleküle mit einer relativen molekularen Masse von 24 – 60 kDa, welche nach Aktivierung durch die Rezeptoren hetero-oligomere Komplexe formen und in den Kern wandern. Zur Zeit sind acht verschiedene SMAD-Proteine in Säugetieren identifiziert worden. Sie können in drei Unterklassen eingeteilt werden: R-SMADs (Rezeptor-aktivierte SMADs), Co-SMADs und I-SMADs (inhibitorische Smads). SMADs 1, 2, 3, 5 und 8 sind R-SMADs. SMAD 4 ist ein Co-SMAD. SMADs 6 und 7 sind I-SMADs (Korchynsky und ten Dijke, 2002).

Der Typ 1 Rezeptor interagiert mit den R-SMADs, welche nach Phosphorylierung vom Rezeptor dissoziieren, SMAD 4 binden und in den Kern eintreten. Im Kern regulieren die heteromeren SMAD-komplexe die Transkription von BMP-Genen. Dies geschieht mit Hilfe von Zielgen-spezifischen DNA-bindenden Proteinen, da die SMADs DNA nur mit niedriger Affinität und Spezifität alleine binden können (Derynck et al., 1998; ten Dijke et al., 2000).

Produkte der Zielgene sind entsprechend den vielfältigen Funktionen der BMPs auch sehr unterschiedliche Gruppen von Proteinen. Dazu zählen zum Beispiel Komponenten der extrazellulären Matrix, wie Osteocalcin (Katagiri et al., 1994), Osteopontin (Ahrens et al., 1993), oder Kollagen (Maliakal et al., 1994), Regulatoren der Transkription, wie Msx-2 (Sirard et al., 2000), Ids (Ogata et al., 1993; Hollnagel et al., 1999), oder JunB (Chaloux et al., 1998), Inhibitoren der BMP-Funktion, wie SMAD 6 oder SMAD 7 (Imamura et al., 1997; Nakao et al., 1997; Takase et al., 1998), Wachstumsfaktoren, wie CTGF (Nakanishi et al., 1997), und auch verschiedensten Enzyme, wie Alkalische Phosphatase (Katagiri et al., 1994) und verschiedene Proteasen.

Die folgende Abbildung gibt noch einmal einen schematischen Überblick über die SMAD-Signalkaskade (Abb.3).

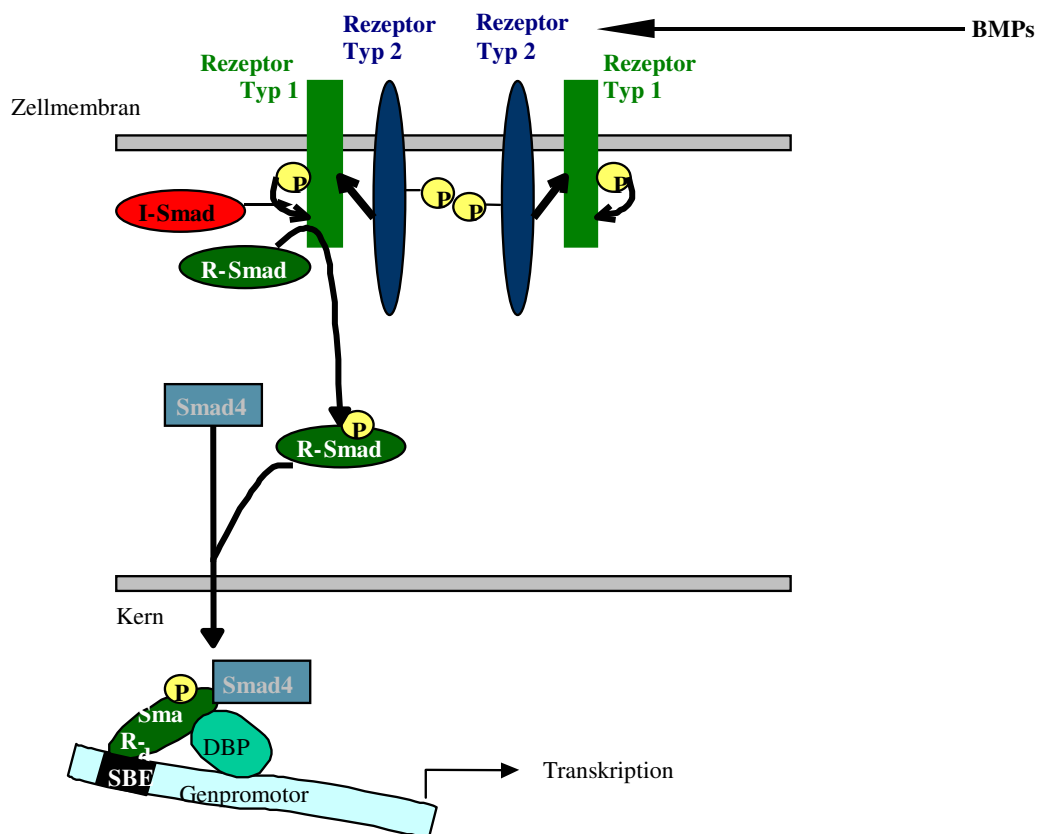


Abb. 3: Signalkaskade von BMPs

Da die Erkenntnisse auf diesem Gebiet noch lange nicht vollständig sind, sind der SMAD-Signalweg, sowie andere zytoplasmatische Signalwege, wie z.B. TAK-1 oder MAP-Kinase, bzw. auch Cross-talk zwischen diesen Signalwegen Gegenstand weiterer Untersuchungen.

2.2.4 Biologische Funktionen

Die biologische Aktivität der BMPs wurde *in vivo* an einer Vielzahl von Tiermodellen und *in vitro* an diversen Zelllinien untersucht (Cook und Rueger, 1996; Reddi, 1998; Ripamonti und Duneas, 1998; Schmitt et al., 1999; Kirker-Head, 2000; Azari et al., 2001; Ripamonti et al., 2001).

Aufgrund ihrer Entdeckung im Knochen wurden die meisten Studien an Knochenzellen und Tiermodellen, die Knochendefekte aufwiesen, durchgeführt. Aber auch verwandte Gewebe wie Knorpel oder andere Hartgewebe wie Dentin wurden untersucht. In letzter Zeit wurden auch weiche Gewebe wie Gehirn (Helm et al., 2000; Liu et al., 2001), Niere (Vukicevic et al., 1998; Reddi, 2000), Lunge (Bellusci et al., 1996) und andere in die Untersuchungen mit einbezogen.

Die Entschlüsselung des BMP-Expressionsmusters sowie die Analyse spontan mutierter oder genetisch veränderter Tiere haben die Bandbreite ihrer Funktionen demonstriert.

Die Aktivitäten sind vorwiegend Teil epithelial-mesenchymaler Wechselwirkungen, einschließlich aber nicht ausschließlich am Skelett (Lyons et al., 1989; Vukicevic et al., 1990a+b; Vukicevic et al., 1994a+b; Helder et al., 1995; Lyons et al., 1995; Martinovic et al., 1996; Takahashi und Ikeda, 1996; Vukicevic et al., 1996). BMPs beeinflussen auch die kraniofaziale Entwicklung und die Zahnentwicklung (Vainio et al., 1993; Thesleff, 1995; Thesleff et al., 1995; Aberg et al., 1997; Helder et al., 1998; Peters und Balling, 1999). Außerdem spielen sie eine Rolle bei der Erhaltung von vaskulären Muskelzellen sowie in der Spezifizierung des kardiogenen Mesoderm und der frühen Entwicklung des Herzens (Schultheiss et al., 1997; Ladd et al., 1998; Dorai et al., 2000; Yamada et al., 2000). Sie sind essentiell für die Migration und / oder Fusion des primordialen Herzens und der Differenzierung der Kardiomyozyten (Walters et al.,

2001) und wirken sogar bei der Ausbildung der links-rechts Asymmetrie des Herzens mit (Branford et al., 2000). BMPs werden in zahlreichen anderen Geweben, wie Haut, Haaren, Ovarien und Testes exprimiert und spielen bei deren Organogenese und Funktion eine wichtige Rolle.

Auch in der Brustdrüse wurde die Expression von BMPs, speziell BMP-2 und BMP-4, beschrieben und mit der Kontrolle der Morphogenese assoziiert (Jones et al., 1991; Hogan et al., 1994; Davidson, 1995; Phippard et al., 1996).

Die Rolle von BMPs bei Migrations- und Invasionsvorgängen wurde bereits an verschiedenen Zelltypen untersucht. Für BMP-2 und BMP-4 konnte gezeigt werden, dass sie die Migration von Monozyten, Osteoblasten und glatten Gefäßmuskelzellen stimulieren (Cunningham et al., 1992; Lind et al., 1996; Willette et al., 1999). Auch in Lungenkrebszelllinien konnte ein chemoattraktiver Effekt von BMP-2 nachgewiesen werden (Langenfeld et al., 2003).

Wie oben beschrieben regulieren BMPs also die verschiedensten biologischen Prozesse und sind an der Entwicklung fast aller Organe und Gewebe beteiligt. Außerdem sind ihre Effekte abhängig von äußeren Umständen, wie z.B. dem Typ der Zielzelle oder der Konzentration des Liganden (Hogan, 1996).

2.2.5 Expression in Tumoren

BMPs werden nicht nur in normalen Geweben exprimiert, sondern auch in ihren korrespondierenden Tumorgeweben.

Dies wurde an diversen Tumoren, wie z.B. dem Osteosarkom (Arihiro et Inai, 2001; Murphy et al., 2001; Yanagawa et al., 2001; Gobbi et al., 2002; Sulzbacher et al., 2002), dem Prostatakarzinom (Harris et al., 1994; Barnes et al., 1995; Kim et al., 2000; Thomas et Hamdy, 2000; Tamada et al., 2001; Masuda et al., 2003;), dem Kolonkarzinom (Imai et al., 2001), dem Nephroblastom (Higinbotham et al., 1998), dem Pankreaskarzinom (Kleef et al., 1999) oder dem Ovarialkarzinom (Kiyozuka et al., 2001) gezeigt.

Auch für das Mammakarzinom wurde die Expression von BMPs beschrieben (Clement et al., 1999; Clement et al., 2000; Reinholz et al., 2002). Die biologischen Funktionen sind Gegenstand derzeitiger Untersuchungen und auch dieser Arbeit.

2.2.6 Klinische Bedeutung

Neben ihrer einzigartigen Knochen induzierenden Wirkung, hat die letzte Dekade eine Reihe an morphologischen, genetischen und biochemischen Daten gebracht, die die essentielle Funktion der BMPs in Entwicklungsprozessen und Morphogenese vieler Spezies betonen.

BMPs sind in der Lage, durch Rekapitulation der zellulären Ereignisse, die an der Bildung von Knochen während der embryonalen Entwicklung beteiligt sind, Knochen im postfetalen Leben zu regenerieren. Klinische Studien über den Einsatz rekombinanter BMPs bei orthopädischen Rekonstruktionen u.ä. zeigen die Strategien für den therapeutischen Einsatz am Menschen (Friedlaender et al., 2001).

Die Identifizierung und Charakterisierung von BMP-spezifischen Rezeptoren, ihren intrazellulären Signalmolekülen und Zielgenen stellen die Basis für die endogene Hochregulation von BMPs bei Patienten mit Osteoporose und zahlreichen metabolischen Knochenerkrankungen dar (Vukicevic et al., 1998).

Neben ihrer Rolle bei der Regeneration und Erhaltung von Knochengewebe, agieren BMPs als Differenzierungsfaktoren, sowie als physiologische Regulatoren in der Homöostase verschiedenster Gewebe. Dies ist Grundlage für den therapeutischen Nutzen bei einer Vielzahl von klinischen Indikationen.

Auch die veränderte Expression der BMPs in Tumoren, speziell dem Mammakarzinom, birgt die Möglichkeit für spätere diagnostische oder therapeutische Einsätze der Knochenmorphogenesefaktoren selbst bzw. ihrer Inhibitoren.

2.3 Ziel der Arbeit

BMPs regulieren in der Entwicklung verschiedener Organe wichtige Migrationsvorgänge bestimmter Zellgruppen. Im Tumorgeschehen führen Invasion und Migration zur Ausbreitung der Tumorzellen. Deshalb sollte im ersten Teil der Arbeit die migratorische und invasive Kompetenz von Mammakarzinomzelllinien in Gegenwart von rekombinantem BMP-2 untersucht werden.

Die Invasion von Tumorzellen erfordert die Aktivität von Proteasen. Mit Hilfe eines cDNA-Mikroarrays sollte die Expression von Proteasen unter dem Einfluß von BMP-2 untersucht werden. Zur Absicherung der erhobenen Daten sollten die Gene, die eine deutlich veränderte Expression zeigten, durch RT-PCR überprüft werden.

Ziel dieser Untersuchungen war es die molekularbiologischen Veränderungen durch Einwirkung von BMP-2 auf Mammakarzinomzelllinien zu erforschen, um die Mechanismen der Tumorprogression und der Metastasierung besser zu verstehen.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Zellkultur

3.1.1 Zelllinien

Folgende humane Mammakarzinom-Zelllinien wurden verwendet: MCF-7, BT-20, BT-474,

T-47-D und SK-BR-3 (American Type Culture Collection oder Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig). MCF-7 und BT-20 wurden mit DMEM plus 10% fötales Kälberserum (FCS), BT-474, T-47-D und SK-BR-3 wurden mit RPMI 1640 plus 10% FCS bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Sowohl Zellkulturmedium als auch Kälberserum wurden von Invitrogen (Eggenstein) bezogen.

Die folgenden Arbeitsschritte wurden alle unter einer Sterilbank (Heraeus, Hanau) durchgeführt.

3.1.2 Aufbereitung der Zellen

Das alte Medium der Zellkulturen wurde verworfen und die Zellen dreimal mit 5 ml PBS-Puffer gewaschen. Nach Zugabe von 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung und ca. 5 minütiger Inkubation bei 37°C waren die Zellen vom Boden gelöst und wurden in 6 ml Medium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde 5 min bei 1000 U/min und 21°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Zellpellet zur Weiterverarbeitung mit 1-2 ml neuem Medium wieder gelöst.

3.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Dazu wurden 50 μ l der entstandenen Zellsuspension mit 20 ml Isoton gemischt. Dies wurde im Counter Z2 (Beckman-Coulter, Krefeld) dreimal gezählt und der errechnete Mittelwert entsprach der Zellzahl pro 1000 μ l.

Dann wurden 2×10^6 Zellen pro Gewebekulturflasche ausgesät und mit neuem Medium versehen.

Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Zellen dreimal mit 5 ml PBS-Puffer gewaschen und mit serumfreien (ohne FCS-Zusatz) Medium weitere 24 h kultiviert.

3.1.4 Zellkulturüberstände

Nach 24-stündiger serumfreier Inkubation der Zelllinie SK-BR-3 wurde das Medium abgenommen und bei -20°C eingefroren.

3.2 Migrationsassay

Chemotaxis ist die zielgerichtete Zellbewegung entlang eines Gradienten. Im folgenden sollte die chemotaktische Wirkung von rhBMP-2 auf Mammakarzinom-Zelllinien untersucht werden.

3.2.1 Vorbereitung der Zellen

Wie unter 3.1 beschrieben wurden 2×10^6 Zellen ausgesät, 24 h mit Medium plus 10% FCS und danach 24 h serumfrei kultiviert.

3.2.2 Versuchsaufbau

In einem 2-Kammer-System, das durch eine semipermeable Transwell-Membran getrennt war, wurde ein chemotaktischer Gradient wie folgt aufgebaut.

In Mikrowell-Platten wurden jeweils 500 µl serumfreies Medium plus unterschiedliche Konzentrationen BMP-2, Medium plus 10% FCS (Positivkontrolle), NIH 3T3-Überstand (Negativkontrolle) oder SK-BR-3-Überstand vorgelegt. In die Vertiefungen wurden die Membranen mit einer Porengröße von 8µm (Becton Dickinson, Heidelberg) gesetzt, auf denen anschließend 50.000 Zellen (aufgenommen in 400 µl serumfreiem Medium) ausgesät wurden.

3.2.3 Auswertung

Nach einer Inkubationszeit von 19 h wurden die Transwell-Einsätze herausgenommen, das Medium mit den Zellen verworfen und die nach oben zeigende Seite der Membran mit einem Wattestäbchen gereinigt. Die auf der Unterseite verbleibenden Zellen wurden mit Diff-Quick (Dade Behring, Marburg) fixiert und angefärbt und unter dem Lichtmikroskop betrachtet. Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte durch die Summierung 20 zufällig ausgewählter Gesichtsfelder bei einer 40fachen Vergrößerung.

3.3 Invasionsassay

Tumorzellen zeichnen sich u.a. durch eine erhöhte Invasivität aus. Der Invasionsversuch nach dem Modell der Boyden Chamber sollte die Wirkung von BMP-2 auf die Invasivität von Mammarkarzinom-Zelllinien untersuchen. Der Ansatz bietet so ein geeignetes *in vitro* Modell für die *in vivo* Ausbreitung von Metastasen.

3.3.1 Vorbereitung der Zellen und Inkubation

Wie im vorher beschriebenen Migrationsversuch wurden 2×10^6 Zellen ausgesät, 24 h unter serumhaltigen Bedingung und 24 h serumfrei kultiviert.

Dann erfolgte eine 5-stündige Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen BMP-2 (aufgenommen in serumfreiem Medium oder in SK-BR-3-Überständen), Medium plus 10% FCS, serumfreiem Medium und SK-BR-3-Überständen. Danach wurde das Medium abgenommen, die Zellen, wie in 3.1 beschrieben, mit Trysin/EDTA-Lösung abgelöst und gezählt.

3.3.2 Versuchsaufbau

Es handelte sich wieder um ein 2-Kammer-System, das durch eine Membran getrennt war.

Im Gegensatz zum Migrationsversuch war die semipermeable Membran in dem 2-Kammer-System allerdings beschichtet. Die PVDF-Membran (Whatman, Göttingen) wurde mit der glänzenden Seite nach oben in einer Petrischale fixiert, mit 50 μ l Matrigel (1:50 Verdünnung; Becton-Dickenson, Heidelberg) beschichtet, 1 h unter der Sterilbank getrocknet und anschließend mit DMEM abgespült.

In den unteren Teil der Boyden Chamber wurden 200 μ l NIH 3T3-konditioniertes Medium gegeben. Die PVDF-Membran wurde, mit der glänzenden und beschichteten Seite nach oben, vorsichtig und luftblasenfrei auf die Kammer gelegt. Zur Fixierung des Filters wurde die Kammer zugeschraubt. Anschließend wurden 200.000 Zellen, die in 400 μ l Kulturmedium wieder aufgenommen wurden, in die obere Kammer gegeben.

3.3.3 Auswertung

Nach 1,5 h, 2 h, und 2,5 h wurden die Membranen aus der Boyden Chamber herausgenommen. Dazu wurde bei geschlossener Kammer das Medium abgegossen, die

Membran mit einem Wattestäbchen gereinigt, die Kammer aufgeschraubt und die Membran vorsichtig entnommen. Die an der Unterseite der Membran haftenden Zellen wurden mittels Diff-Quick (Dade-Behring, Marburg) fixiert und angefärbt und unter dem Lichtmikroskop betrachtet. Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte durch die Summierung 20 zufällig ausgewählter Gesichtsfelder bei einer 40-fachen Vergrößerung.

3.4 RNA-Isolierung

Die Isolierung der RNA aus Zellkulturen erfolgte mit dem Rneasy Total RNA Kit (Qiagen, Hilden). Alle Arbeitsschritte und Zentrifugationen fanden bei Raumtemperatur statt.

3.4.1 Vorbereitung der Zellen

Die Zellen wurden, wie unter 3.1 beschrieben, ausgesät (1×10^6 Zellen), 24 h mit FCS-haltigem Medium und 24 h serumfrei kultiviert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen mit 50 ng/ml BMP-2 oder serumfreiem Medium für 5 bzw. 24 Stunden. Dann wurden sie abtrypsiniert, in 10 ml PBS-Puffer aufgenommen und 5 min bei 1000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen.

3.4.2 Isolierung der Gesamt-RNA

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte mit dem RNeasy-Kit (Qiagen, Hilden). Das Zellpellett wurde in 500 µl Lysepuffer (RLT-Puffer plus 1% (v/v) β -Mercaptoethanol) gelöst. Dieser Guanidin-Isothiocyanat-enthaltende Puffer inaktivierte durch seine stark denaturierende Wirkung die RNAsen und ermöglichte so die Isolierung intakter RNA.

Dieses Gemisch wurde in einen Filtereinsatz mit einem lila Deckel (Qiashreder Spin Column) gegeben und 2 min bei 14.000 U/min zentrifugiert. Dadurch wurde die hochmolekulare genomische DNA des Zellysats im Filter zurückgehalten.

Zu dem Zentrifugat wurden 500 µl Ethanol (70%-ig) beigesetzt und nach guter Vermischung in einen Filtereinsatz mit rosa Deckel (Silica-Gel-Membran; Rneasy Spin Column) gegeben. Durch Zentrifugation wurde die RNA in der Membran angereichert.

Durch folgende Waschschriffe wurden Verunreinigungen im RNA-Isolat beseitigt:

Zugabe von 500 µl RW1-Waschpuffer in den rosa Deckel, 10 min stehen lassen, 15 sec bei 10.000 U/min zentrifugieren, 300 µl RPE-Waschpuffer dazugeben, 15 sec bei 10.000 U/min zentrifugieren, nochmal mit 300 µl RPE-Puffer versetzen und 2 min bei 10.000 U/min zentrifugieren.

Genau auf die Membran des rosa Deckels kamen dann 50 µl RNase-freies Wasser (1 x 30 µl und 1 x 20 µl) und es wurde nochmal zentrifugiert (60 sec bei 10.000 U/min). Die so eluierte RNA wurde bei -80°C eingefroren oder für die cDNA-Synthese weiterverarbeitet.

3.4.3 RNA-Messung

Die RNA-Konzentration im Eluat wurde photometrisch bestimmt (Pharmacia LKB Ultrospec III).

Dazu wurde die RNA im Verhältnis 1:50 verdünnt (6 µl RNA-Lösung auf 294 µl Aqua dest.) und in Präzisions-Küvetten aus Quarzglas (Hellma) gemessen. Bei drei Wellenlängen (260, 280 und 320 nm) wurden die jeweiligen Absorptionen ermittelt.

Das Absorptionsmaximum der RNA liegt bei 260 nm, was auf die aromatischen Ringe der Basen zurückzuführen ist. Aus diesem Wert errechnete das Gerät die RNA-Konzentration in µg/ml, welches nach Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors dem Gesamt-RNA-Gehalt entsprach.

Proteine haben aufgrund der Absorption der aromatischen Aminosäurereste ein Absorptionsmaximum bei 280 nm. Andere Verunreinigungen werden bei 320 nm

erfaßt. Aus dem Verhältnis der Absorption bei allen drei Wellenlängen läßt sich eine Aussage über die Reinheit der Nukleinsäurelösung treffen.

3.5 cDNA-Synthese

Die Herstellung eines komplementären DNA-Stranges zu einer RNA-Matrize erfolgt durch reverse Transkription.

Pro Ansatz wurde nicht mehr als 1 µg RNA (bis 8,5 µl) eingesetzt, welche 5 min bei 65°C im Wasserbad erhitzt wurde, um Sekundärstrukturen aufzulösen.

In dieser Zeit wurde der RT-Mix auf Eis vorbereitet. Dieser bestand aus

4 µl 5x 1-Strang Synthese Puffer (Invitrogen),

2 µl DTT (0,1 M; Invitrogen),

2 µl Random-Primer (0,2 mg/ml; ein Gemisch aller möglichen Hexanukleotide (Roche Biochemicals), welches den Synthesestart an jeder beliebigen Stelle auf dem RNA-Strang ermöglicht),

2 µl dNTP-Gemisch (jeweils 10 µM dATP, dCTP, dGTP und dTTP (New England Biolab) für die Synthese selbst),

0,5 µl RNasin (20 U; ein RNase-Inhibitor, der mit RNasen nichtkovalente äquimolare Komplexe bildet; Invitrogen) und

1 µl M-MVL Reverse Transkriptase (ein aus Retroviren isoliertes Enzym; Invitrogen).

Die RNA wurde mit 11,5 µl RT-Mix vermischt, 10 min bei Raumtemperatur stehengelassen (Anlagerung der Primer) und 60 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte die Inaktivierung der Reversen Transkriptase bei 95°C für 5 min im Wasserbad.

Die synthetisierte cDNA wurde bei -20°C eingefroren oder in einer PCR-Reaktion weiterverarbeitet (s. 3.7).

3.6 *Proteasen-cDNA-Microarray*

3.6.1 Vorbereitung

Es wurden MCF-7-Zellen ausgesät. Diese wurden 24 h serumhaltig und 24 h serumfrei kultiviert und anschließend mit 50 ng/ml BMP-2 oder serumfrei für weitere 24 h oder 5 h inkubiert bzw. ohne zusätzliche Inkubation weiterbehandelt.

Aus diesen Zellen wurde RNA isoliert und diese gemessen (s. 3.3).

3.6.2 Digoxigenin-Labeling während der reversen Transkription

Dann wurden 5 µg der RNA mit 1,5 µl Oligo-dT 15-Primer (0,5 µg/µl, Promega) und Wasser (Menge variierte je nach RNA-Volumen – Gesamtvolumen: 30 µl) für 15 min bei 65 °C denaturiert und anschließend 5 min auf Eis gegeben.

In angegebener Reihenfolge wurden folgende Lösungen hinzupipettiert:

- 6 µl First strand buffer (5x, Invitrogen)
- 2 µl DTT (100 mM)
- 0,7 µl RNaseOUT (40 U/µl, Invitrogen)
- 2,5 µl dNTP's (5 mM each, dATP; dCTP; dGTP)
- 1 µl dTTP (3,25 mM)
- 2 µl DIG-dUTP (0,7 mM, alkali-labil, Roche)
- 1,8 µl Superscript II – Reverse Transkriptase (200 U/µl)

Die Reaktionszeit betrug 90 min (75 min bei 42 °C und 15 min bei 72 °C).

Zum Abstoppen der Reaktion wurde 1 µl EDTA (200 mM – Endkonzentration ca. 7 mM) pro 30 µl Gesamtansatz zugegeben.

3.6.3 Fällung der Sonde

Zur Präzipitation wurde dem Reaktionsprodukt 0,1 Vol 4M LiCl und 2,5-3 Vol eiskalter Ethanol beigemischt. Dies wurde 30 min bei -70°C inkubiert und anschließend für 15 min bei 4°C und 13.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit ca. 500 μl eiskaltem 70 %-igem Ethanol gewaschen und nochmals für 5 min bei 4°C und 13000 g zentrifugiert. Dann wurde das Pellet getrocknet und in 50 μl TE-Puffer (Tris-base, EDTA) resuspendiert.

3.6.4 Prähybridisierung

Zunächst wurden

90 μl Heringssperma-DNA (10 $\mu\text{g/ml}$, Endkonzentration: 150 $\mu\text{g/ml}$) und
25 μl pBluescript SK (-) xAluI (6 $\mu\text{g}/25\text{ }\mu\text{l}$, Endkonzentration: 1 $\mu\text{g/ml}$) mit
1 ml der Hybridisierungslösung (DIG easy hyb)

bei 95°C für 10 min denaturiert (für ein Gesamtvolumen von 6 ml).

Dann wurde die Filtermembran (Nylon Membrane Positively Charged, Roche – mit freundlicher Unterstützung des Instituts für Immunologie, PD Dr. med. Christoph Klein, LMU München) in die Hybridisierungsröhre (Schott, Jena) gelegt und mit bidestilliertem Wasser angefeuchtet. Dazu wurden weitere 5 ml der auf 68°C vorgewärmten Hybridisierungslösung (DIG easy hyb) gegeben und anschließend die frisch denaturierte DNA dazupipettiert (nicht direkt auf die Membran).

Die Röhre wurde zur Prähybridisierung über Nacht bei 42°C im Hybridisierungssofen (Robbins Scientific) inkubiert.

3.6.5 Hybridisierung

Der Ablauf entsprach dem der Prähybridisierung, jedoch kam die vorgefertigte Sonde noch dazu.

Für ein Gesamtvolumen von 3 ml wurden

1 ml Hybridisierungslösung (DIG easy hyb),

45 µl Heringssperma-DNA (10 µg/ml, Endkonzentration: 150 µg/ml),

25 µl pBluescript SK (-) xAluI (6 µg/25 µl, Endkonzentration: 2 µg/ml) und die

DIG-markierte Sonde (Menge je nach Experiment, s. 3.6.3.)

bei 95 °C für 10 min denaturiert.

Aus dem Greiner-Röhrchen wurde die Prähybridisierungslösung abgegossen und 2 ml der auf 68 °C vorgewärmten Hybridisierungslösung zugegeben. Dazu kam dann die frisch denaturierte Sonde. Die Hybridisierung erfolgte über 2 Tage im Ofen bei 42 °C.

Die Temperatur wurde für die DIG easy Hyb und die Formamid-haltigen Puffer in Abhängigkeit vom GC-Gehalt der Probe und dem Grad der Homologie kalkuliert:

$$T_m = 49,82 + 0,41 (\% \text{ GC} + C) - (600/L)$$

L: Länge des Hybrids in

Basenpaaren

Die angegebenen Zahlenwerte bezogen sich auf eine Standardhybridisierung mit einem Formamidgehalt von 50 %. Die aktuelle Temperatur in DIG easy Hyb war 20-25 °C unter dem kalkulierten T_m .

Für die Hybridisierung genomischer DNA mit einer 100 % homologen Probe ergab sich eine Hybridisierungstemperatur von 37-42 °C in Abhängigkeit vom GC-Gehalt.

3.6.6 Waschen der Membran

Nach der Hybridisierung wurden die Membranen 5 min bei Raumtemperatur in 2x SSC + 0,1 % SDS und 5 min in 1x SSC + 0,1 % SDS gewaschen. Dann wurde 2x 15 min bei 68 °C mit 0,5x SSC + 0,1 % SDS und anschließend 2x 45 min bei 68 °C mit 0,1x SSC + 0,1 % SDS im Hybridisierungsofen gewaschen (vorgewärmte Lösung, 68 °C).

3.6.7 Entwickeln der Membran

Die Membranen wurden aus der Hybridisierungsröhre genommen, in eine Schale gelegt und kurz (1-5 min) in Puffer 1 (150 mM NaCl, 100 mM Maleinsäure; pH 7,5 mit NaOH-Plättchen oder konzentrierter NaOH-Lösung eingestellt) gewaschen.

Zur Blockierung wurden die Membranen 60 min bei Raumtemperatur in 1x Blockierungslösung (ca. 25 ml; Blockierungsreagenz-Stammlösung (1:10 in Puffer 1 verdünnt; Endkonzentration 1% Blockierungsreagenz) inkubiert.

Der Antikörper wurde 1:10.000 in 1x Blockierungslösung verdünnt (2,5 µl auf 25 ml; Endkonzentration: 75 mU/ml), auf die Membranen gegeben (15 ml) und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

In einer neuen Schale wurden die Membranen 3 x 10 min bei Raumtemperatur in reichlich (50-100 ml) Waschpuffer (Puffer 1 + 0,3 % Tween-20) erneut gewaschen.

3.6.8 Detektion

Zunächst wurde CSPD-Lösung (Substrat) 1:100 in Detektionspuffer (0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl; pH 9,5) verdünnt (10 µl CSPD + 990 µl Detektionspuffer).

Die Membranen wurden 2-5 min in ca. 20 ml Detektionspuffer äquilibriert. Dann wurden die Membranen abgetropft (nicht ganz trocknen) und auf Klarsichtfolie, welche vorher mit Wasser und Ethanol gesäubert wurde, gelegt. Darauf wurde die fertig verdünnte CSPD-Lösung verteilt und die Folie so geschlossen, daß keine Luftblasen entstanden.

Nach 5 min bei Raumtemperatur wurden die Membranen wieder abgetupft und in neue saubere Klarsichtfolie gelegt. Diese wurde dann zur Verstärkung der Lumineszenzreaktion 15 min bei 37 °C inkubiert und anschließend auf einen Film aufgelegt.

Dieser wurde 40 min exponiert und anschließend in einer Entwicklermaschine (AGFA Curix 60) entwickelt.

3.6.9 Auswertung

Der fertige Film wurde eingescannt und mit Hilfe des Computerprogramms AIDA rechnerisch ausgewertet. Die Rohdaten wurden hinsichtlich der Hintergrundintensitäten korrigiert und die Mittelwerte von zwei korrespondierenden Signalen wurden berechnet. Um die Vergleichbarkeit unabhängiger Experimente herzustellen, wurden die Werte auf die Referenzgene, die sogenannten „housekeeping genes“ β -Aktin, GAPDH, R13a und rS9, normalisiert.

3.7 PCR

3.7.1 RT-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR = engl. polymerase chain reaction) ist eine Methode zur Amplifikation von Nukleinsäuren. Die PCR erlaubt semiquantitativ Rückschlüsse auf die Menge der zur cDNA korrelierenden mRNA eines bestimmten Proteins. Bei der Methode dient die zuvor aus der Reversen-Transkriptase-Reaktion gewonnene cDNA als Matrize, entlang der nun mit Hilfe des Enzyms Taq-Polymerase die DNA vervielfacht wird.

Dazu wurde je 1 μ l der cDNA (s. 3.5) mit 24 μ l PCR-Ansatz vermischt. Jeder Ansatz enthielt

18,3 μ l Aqua dest.,

2,5 μ l 10xPCR-Puffer,

1,0 μ l Primer-Gemisch (jeweils 10 μ M sense- und antisense-Primer),

2,0 μ l dNTP-Mix (jeweils 10 μ M dATP, dCTP, dGTP und dTTP) und

0,2 μ l Taq-Polymerase (1 U; hitzestabiles, bakterielles Enzym [aus *Thermus aquaticus*]).

Als Kontrolle wurde bei einer Probe anstelle der cDNA Wasser zugegeben.

Für die PCR-Analysen wurden folgende Primerpaare eingesetzt:

Cathepsin B:	sense	CCAGGGAGCAAGACAGAGAC
	antisense	GAGACTGGCGTTCTCCAAAG
Cathepsin D:	sense	GACACAGGCACTTCCCTCAT
	antisense	CTCTGGGGACAGCTTGTAGC
Cathepsin H:	sense	AGTTGTGGGGAGATCCACTG
	antisense	ATTCGTGGTCCATGTGGTTT
Cathepsin K:	sense	ACCCATATGTGGGACAGGAA
	antisense	CGCTATTGCAGCTTTCATCA
Cystatin A:	sense	GGCTTATCTGAGGCCAAACC
	antisense	TTTGTCCGGGAAGACTTTTG
Cystatin C:	sense	CCAGCAACGACATGTACCAC
	antisense	ACAGGTGGATTTCGACAAGG
Caspase 7:	sense	CACCCAGGGCTATGAGGATA
	antisense	ATGTGAGGGCAGGATAGGTG
Integrin β 4:	sense	TGGAAGTACTGTGCCTGCTG
	antisense	TGCATGTTGTTGGTGACCTT
Integrin β 5:	sense	ACAAGGGAGTCCTCTGCTCA
	antisense	GGGGCACTTCTCACACATCT

Die Amplifizierung fand im TRIO-Thermocycler (Biometra, Göttingen) statt. Alle PCR-Protokolle begannen mit einer initialen Denaturierung bei 95°C für 3 min, um die hochmolekularen Strukturen der DNA aufzulösen. Dann folgte die Anlagerung, das Annealing der Primer. Die dafür erforderliche Temperatur ist primerspezifisch und lag bei den hier verwendeten Primern bei 62°C. Die darauffolgende Temperaturerhöhung auf 72°C stellt das Aktivitätsoptimum der verwendeten Taq-Polymerase für die Elongation dar. Diese drei Temperaturstufen wurden 30-35 mal durchlaufen bevor die terminale Elongation bei 72°C sicherstellte, daß alle synthetisierten Stränge vollständig verlängert vorlagen.

3.7.2 PCR-Analyse

Nachweis und Analyse der PCR-Produkte erfolgten mittels eines Agarose-Gellaufs.

Dafür wurde 1 g des Polysaccharids Agarose (Agarose ultra pure, Invitrogen) für ein 1%-iges Gel durch Aufkochen in TAE -Puffer (Trisbase 242 g; Eisessig 57,1 ml; EDTA 0,5 M, pH 8,0, 100 ml - auf 1 l mit Aqua dest. aufgefüllt) gelöst. Je 100 ml Gellösung wurden 1,5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugegeben und die Agaroselösung in horizontale Gießkammern (mit Kamm für die Taschen) gegossen.

Dann wurden je 15 µl des PCR-Produkts mit 10 µl Probenpuffer (1 ml Tris-HCl [10 mM], 200 µl Na₂-EDTA [1 mM], 500 µl 0,1% SDS, 30 ml 30% Glycerin, 62,5 µl 0,0025% Bromphenolblau - mit Wasser auf 100 ml auffüllen) gemischt und in eine Tasche des Gels gegeben, welches in einer mit TAE-Puffer gefüllten Gellaufkammer lag. Für PCR-Produkte mit einer Größe von 300-1000 bp wurde ein 1%-iges Gel verwendet. Um DNA niedrigeren Molekulargewichtes auftrennen zu können, wurden 2 bzw. 3%-ige Gele benutzt.

Nach Auftragen der Proben und des Markers (20 µl 1 kb DNA-Ladder, Gibco BRL) zur Molekulargewichtsbestimmung erfolgte die Gelelektrophorese bei 200 mA (Powergerät LKB 2103 Power Supply, Biochrom). Danach wurde das Gel auf einem UV-Transilluminator plziert und die Fluoreszenz der Ethidiumbromid-markierten Banden mit einem Videokamera-gestützten Computersystem (Herolab, Wiesloch) aufgenommen und dokumentiert.

Die quantitative Auswertung der PCR-Produkte erfolgte mit dem Programm LabImage. Die Flächeninhalte der jeweiligen Banden konnten so sehr genau bestimmt werden.

Wenn bei der PCR die Taq-Polymerase bereits im Sättigungsbereich arbeitet, erscheinen bestehende Unterschiede auf mRNA-Ebene nicht mehr als große Unterschiede im PCR-Produkt. Um diesen Fehler weitestgehend auszugleichen, wurde anhand von standardisierten Aktin-Proben eine Eichkurve erstellt. Alle mit Hilfe von LabImage gemessenen Flächeninhalte wurden anhand dieser Eichkurve $[x = \text{EXP} ((y - 40721)/51060)]$ korrigiert (Abb.4).

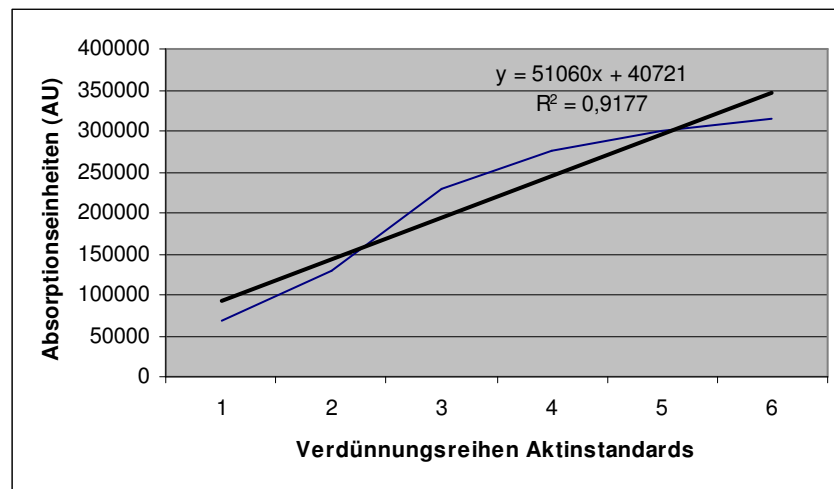


Abb.4: Eichkurve zur Korrektur der PCR-Bandenstärke.

Aktinstandards: 1 = 1×10^{-6} , 2 = 1×10^{-5} , 3 = 1×10^{-4} , 4 = 1×10^{-3} , 5 = 1×10^{-2} , 6 = 1×10^{-1}

Blaue Linie: aufgetragene Messwerte der 6 Aktinstandards. **Schwarze Linie:** Ausgleichsgerade.

Dann wurde ein Quotient aus den einzelnen Werten der unterschiedlichen Inkubationsbedingungen und dem jeweiligen Wert für β -Aktin gebildet. Dies ermöglichte auf einfache Weise, die Werte mit dem „housekeeping gene“ Aktin zu standardisieren und so die unterschiedlichen Bedingungen untereinander vergleichbar zu machen.

3.8 Statistische Auswertung

Aufgrund der geringen Anzahl an Wiederholungen der einzelnen Versuche (Migrations- und Invasionsversuche jeweils drei Versuchsreihen, cDNA-Microarray und PCR jeweils zwei Durchführungen) ist eine statistische Auswertung zur Berechnung von Standardabweichungen und Signifikanzen nicht möglich.

Ich habe mich daher auf eine beschreibende Statistik beschränkt. Dies beinhaltet eine rechnerische Auswertung und Normalisierung der gewonnenen Daten sowie deren kritische Bewertung unter bestimmten Einschlusskriterien. Diese Kriterien sind im Ergebnisteil unter den jeweiligen Versuchen aufgeführt.

4. ERGEBNISSE

4.1 *Migrationsversuche*

Zu Beginn der Studie wurde die chemotaktische Wirkung von BMP-2 auf verschiedene Mammakarzinomzelllinien untersucht.

Dabei wurden die Zelllinien T-47-D, BT-20, BT-474, SK-BR-3 und MCF-7 verwendet. Mit Hilfe des Transwell-Migrationsassays sollte untersucht werden, welchen Einfluß unterschiedliche Konzentrationen von rekombinantem BMP-2 auf diese Zelllinien haben.

Es wurden drei verschiedene Konzentrationen von BMP-2 in serumfreiem Medium eingesetzt, und zwar 1ng/ml, 10ng/ml und 50ng/ml. Als Positivkontrolle wurde serumhaltiges Medium, als Negativkontrolle Zellkulturüberstand von NIH 3T3-Zellen, ein sehr nährstoffarmes Medium, das kaum chemoattraktiv wirksam ist, verwendet (Aaronson und Todaro, 1968).

Die Versuche wurden jeweils dreimal durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durch die Summierung der absoluten Zellzahl von 20 zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern der Transwell-Membran.

Um die Ergebnisse vergleichen zu können, wurden die Mittelwerte der drei Versuche ermittelt und auf die Negativkontrolle normiert. Die Normierung auf NIH 3T3 entspricht in etwa der Eigenwanderung der Zellen und lässt so die Unterschiede der einzelnen Zelllinien bzw. Inkubationen deutlicher darstellen.

Die Ergebnisse sind in Abb. 5 dargestellt. Dabei sind die y-Achsen der Balkendiagramme jeweils gleich. Die Daten der Einzelexperimente sind im Anhang aufgeführt.

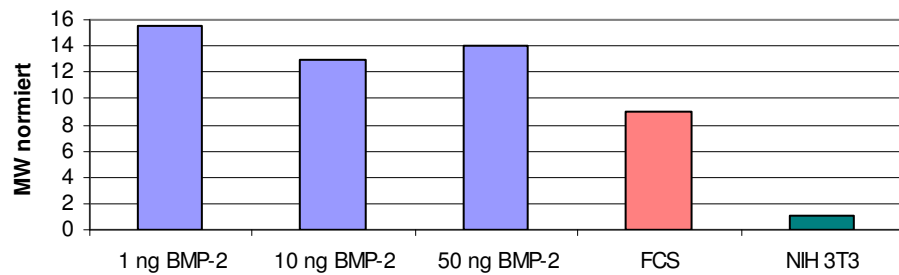
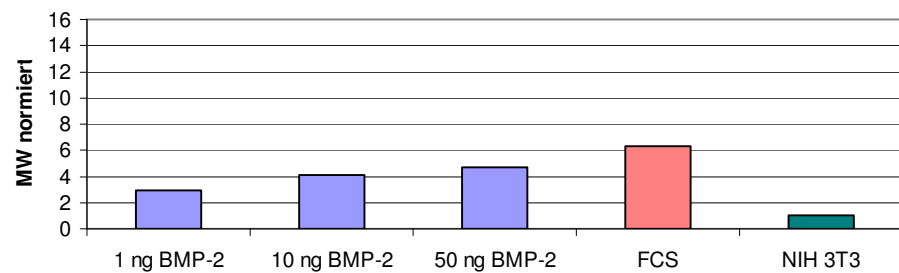
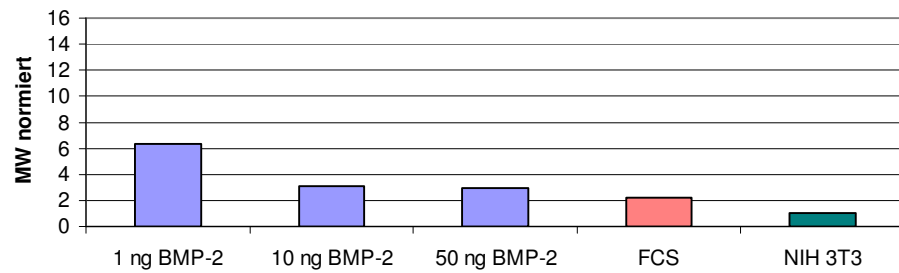
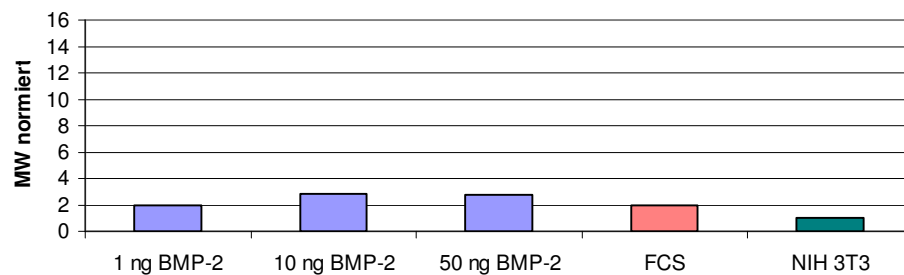
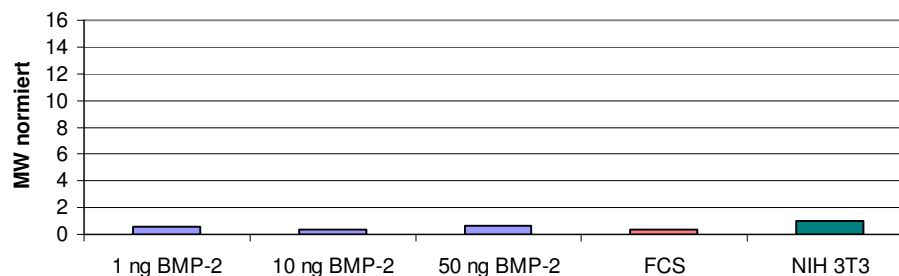
T-47-D**BT-20****BT-474****MCF-7****SK-BR-3**

Abb. 5: Graphische Darstellung der Mittelwerte der Ergebnisse der verschiedenen Konzentrationen von BMP-2 sowie Positiv- (FCS) und Negativkontrolle (NIH 3T3) des Transwell-Migrationsassays der Zelllinien T-47-D, BT-20, BT-474, MCF-7 und SK-BR-3.

Anhand dieser Diagramme wird deutlich, dass BMP-2 in allen Zelllinien – bis auf SK-BR-3 – eine im Vergleich zur Negativkontrolle deutliche Steigerung der Migrationsfähigkeit der Zellen bewirkt. Am ausgeprägtesten ist dies bei T-47-D und BT-20 festzustellen. Sogar im Vergleich zur Positivkontrolle ist die chemotaktische Potenz unter Inkubation mit BMP-2 in den Zelllinien T-47-D, BT-474 und MCF-7 erhöht.

Dabei fällt auf, dass bei T-47-D die Wirkung von BMP-2 unabhängig von der Konzentration etwa gleich ist. Bei BT-20 und MCF-7 kann man eine deutliche Steigerung der Migration von 1 bis 50 ng/ml BMP-2 sehen. Im Gegensatz dazu finden wir bei BT-474 die höchste migratorische Aktivität bei der niedrigsten Konzentration BMP-2, nämlich 1 ng/ml.

Die Ausnahme bildet SK-BR-3. Weder unter serumhaltigen Bedingungen noch unter Inkubation mit BMP-2 konnte eine erhöhte Migration im Vergleich zur Negativkontrolle mit NIH 3T3 gefunden werden. Es ist somit die einzige der untersuchten Zelllinien, die nicht auf die Wirkung von BMP-2 anspricht. Die Insensitivität dieser Zelllinie kann verschiedene Ursachen haben.

Wir gehen davon aus, dass SK-BR-3-Zellen einen Faktor produzieren, der die Wirkung von BMP-2 hemmt. Daluiski et al. stellten die Hypothese auf, dass BMP-3 ein potentieller Antagonist von BMP-2 sein könnte (Daluiski et al., 2001). In unserem Labor konnten wir für BMP-3 die höchste Expression in der Zelllinie SK-BR-3 zeigen (Schwalbe et al., 2000 - Dissertationsschrift) (Abb.6).

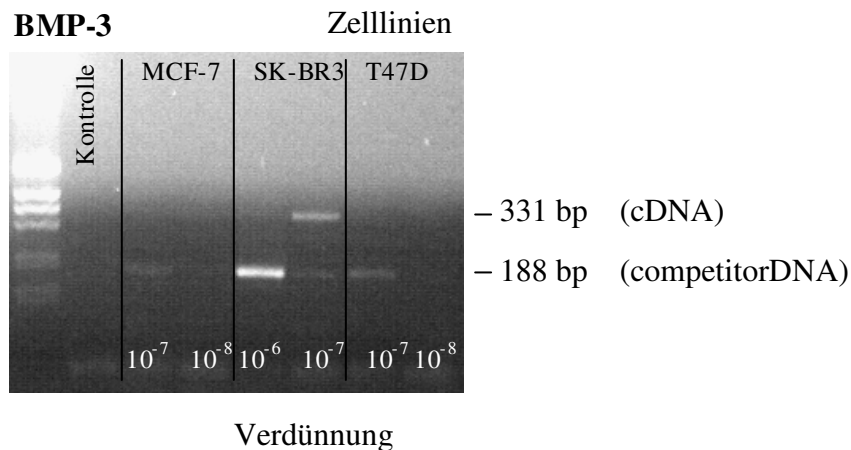


Abb.6: Graphische Darstellung der Expression von BMP-3 in den Zelllinien MCF-7, SK-BR-3 und T-47-D (aus Schwalbe et al., 2000).

Ob BMP-3 verantwortlich für das veränderte Reaktionsverhalten von SK-BR-3 ist, ist jedoch noch nicht geklärt und zur Zeit Gegenstand weiterer Untersuchungen in unserem Labor.

In den folgenden Untersuchungen der Invasivität verwendeten wir als weiteres Inkubationsmedium SK-BR-3-Überstände. Es sollte untersucht werden, ob ein von dieser Zelllinie produzierter und sezernierter, antagonistischer Faktor die Invasivität der Zellen bzw. die Wirkung von BMP-2 beeinflusst.

4.2 Invasionsversuche

Im zweiten Teil der Studie wurde die Wirkung von BMP-2 auf die Invasivität von Mammakarzinomzelllinien untersucht.

Dabei wurden die Zelllinien T-47-D, BT-20, BT-474, SK-BR-3 und MCF-7 mit 50 ng/ml BMP-2 bzw. serumhaltigem Medium als Positivkontrolle, serumfreiem Medium als Negativkontrolle und den oben erwähnten SK-BR-3-Überständen über 5 Stunden inkubiert. Im Gegensatz zu den Migrationsversuchen wurde BMP-2 nicht in der unteren Kammer zugesetzt, sondern die Zellen mit BMP-2 vorinkubiert.

Anschließend wurde mit dem Boyden Chamber Invasionsassay die Invasivität der Zellen nach eineinhalb, zwei und zweieinhalb Stunden geprüft. Dies wurde wie beim Migrationsassay durch Summierung der mikroskopisch ermittelten Zellzahlen in der Membran ausgewertet.

Die Versuche wurden jeweils dreimal durchgeführt.

Um die Ergebnisse vergleichen zu können, wurden die Mittelwerte der drei Versuche ermittelt und auf die Negativkontrolle normiert. Die Normierung auf die Inkubation mit serumfreiem Medium entspricht dabei in etwa der Eigeninvasivität der Zellen und lässt so die Unterschiede der einzelnen Zelllinien bzw. Inkubationen deutlicher darstellen.

Im folgenden sind die normierten Ergebnisse dargestellt (Abb.7 - 11). Dabei sind die y-Achsen der Balkendiagramme jeweils gleich. Die Daten der Einzelerperimente sind im Anhang aufgeführt.

T-47-D

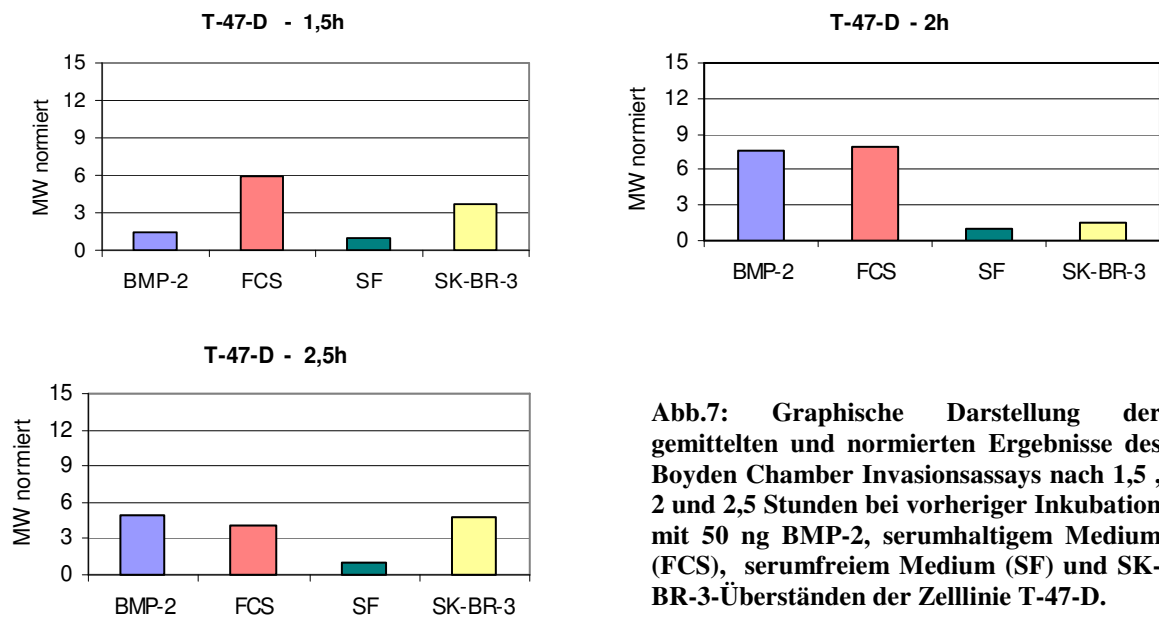


Abb.7: Graphische Darstellung der gemittelten und normierten Ergebnisse des Boyden Chamber Invasionsassays nach 1,5 , 2 und 2,5 Stunden bei vorheriger Inkubation mit 50 ng BMP-2, serumhaltigem Medium (FCS), serumfreiem Medium (SF) und SK-BR-3-Überständen der Zelllinie T-47-D.

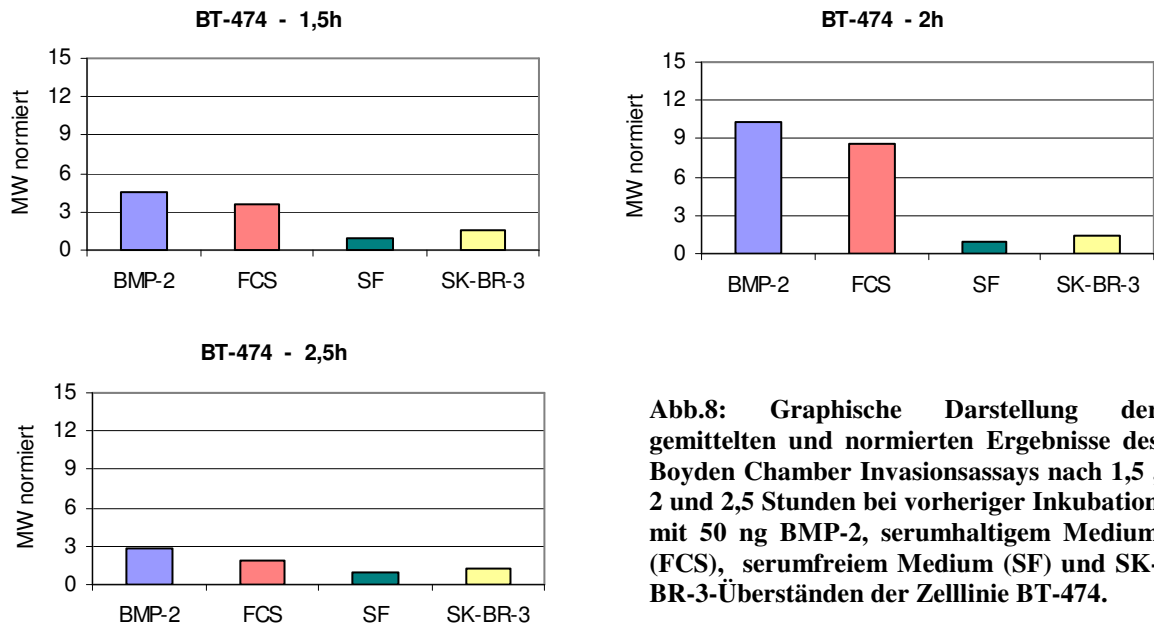
BT-474

Abb.8: Graphische Darstellung der gemittelten und normierten Ergebnisse des Boyden Chamber Invasionsassays nach 1,5 , 2 und 2,5 Stunden bei vorheriger Inkubation mit 50 ng BMP-2, serumhaltigem Medium (FCS), serumfreiem Medium (SF) und SK-BR-3-Überständen der Zelllinie BT-474.

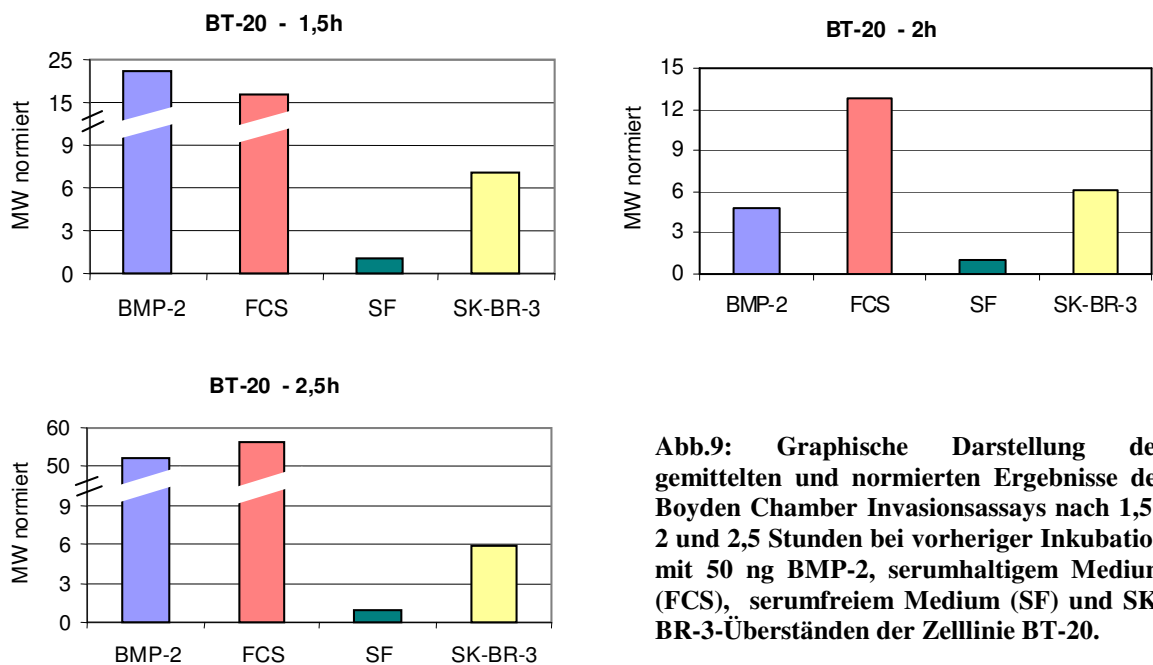
BT-20

Abb.9: Graphische Darstellung der gemittelten und normierten Ergebnisse des Boyden Chamber Invasionsassays nach 1,5 , 2 und 2,5 Stunden bei vorheriger Inkubation mit 50 ng BMP-2, serumhaltigem Medium (FCS), serumfreiem Medium (SF) und SK-BR-3-Überständen der Zelllinie BT-20.

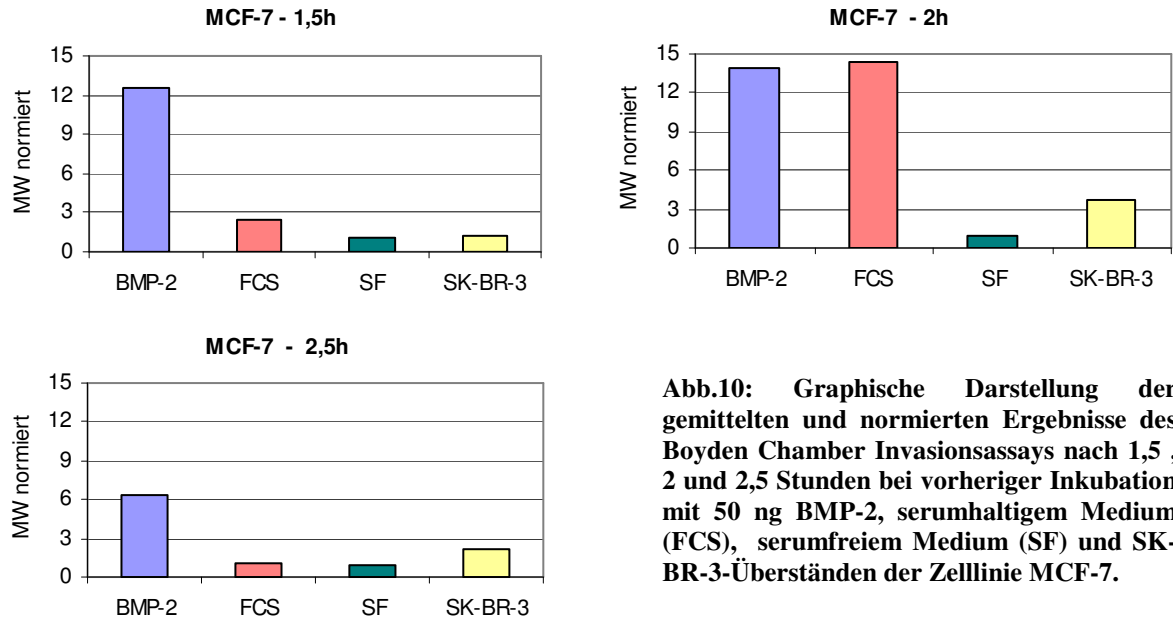
MCF-7

Abb.10: Graphische Darstellung der gemittelten und normierten Ergebnisse des Boyden Chamber Invasionsassays nach 1,5 , 2 und 2,5 Stunden bei vorheriger Inkubation mit 50 ng BMP-2, serumhaltigem Medium (FCS), serumfreiem Medium (SF) und SK-BR-3-Überständen der Zelllinie MCF-7.

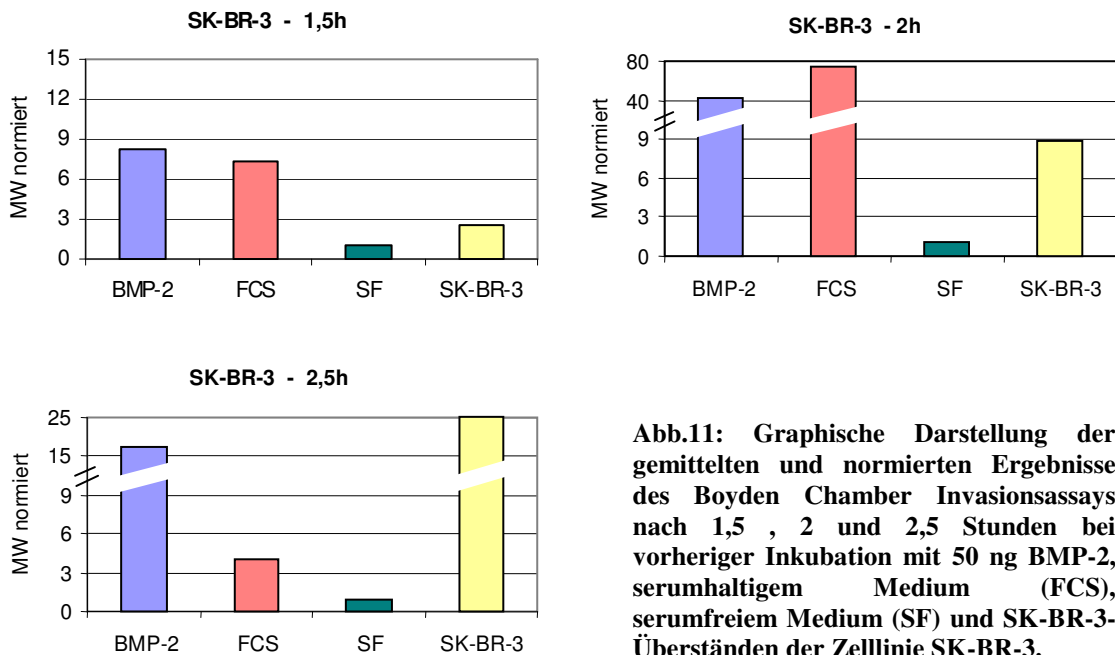
SK-BR-3

Abb.11: Graphische Darstellung der gemittelten und normierten Ergebnisse des Boyden Chamber Invasionsassays nach 1,5 , 2 und 2,5 Stunden bei vorheriger Inkubation mit 50 ng BMP-2, serumhaltigem Medium (FCS), serumfreiem Medium (SF) und SK-BR-3-Überständen der Zelllinie SK-BR-3.

Es konnte gezeigt werden, dass bei allen Zelllinien nach allen drei Auswertungszeitpunkten eine deutliche Steigerung der Invasivität durch Inkubation der Zellen mit BMP-2 im Vergleich zur serumfreien Kontrolle erreicht wurde. Sogar im Vergleich zur serumhaltigen Positivkontrolle war eine Invasivitätserhöhung bei BT-474 zu verzeichnen.

Die Inkubation mit SK-BR-3-Überständen führte im Vergleich zur serumfreien Negativkontrolle nur zu einer geringen Erhöhung der Invasivität, die weit hinter der der serumhaltigen Positivkontrolle bzw. der Inkubation mit BMP-2 zurückblieb.

Die Ausnahme hierbei war BT-20, wo eine im Vergleich zur BMP-2-Inkubation relativ höhere Invasivität durch Inkubation mit SK-BR-3-Überständen erzielt wurde. Dies kann mehrere Ursachen haben. Zum einen sind SK-BR-3-Überstände ein sehr heterogenes Substanzgemisch, welches durchaus proinvasive Faktoren enthält, auf die die Zelllinien unterschiedlich ansprechen. Zum anderen hat BT-20 im Vergleich zu den anderen Zelllinien einen sehr hohen BMP-2 Gehalt, welcher die Empfindlichkeit gegenüber exogen zugeführtem rh-BMP-2 reduzieren kann. Dafür spricht auch, dass BT-20 die einzige Zelllinie in den Migrationsversuchen war, die unter BMP-2 keine höhere Migrationsrate als unter serumhaltigen Bedingungen zeigte. Außerdem zeigen schon die Positivkontrollen mit serumhaltigem Medium einen sehr hohen Ausgangswert bei den Zelllinien BT-20 und SK-BR-3. Sie sind die aggressivsten verwendeten Zelllinien und haben per se ein sehr hohes Invasionspotential, das sich nur schwer steigern lässt.

Die alleinige Inkubation mit serumfreiem Überstandsmedium der Zelllinie SK-BR-3 erhöhte die Invasivität besonders im Vergleich mit dem serumfreien Inkubationsmedium unter Zusatz von BMP-2 nur wenig. Um eine direkte Wechselwirkung von BMP-2 und SK-BR-3-Überständen zu untersuchen, wurde im folgenden die kombinierte Inkubation durchgeführt.

Die Versuche wurden an der Zelllinie MCF-7 mit verschiedenen Konzentrationen BMP-2 (0,1; 1; 10; 50; 100; 200 und 300 ng/ml) in SK-BR-3-Überständen, 10 ng/ml und 100 ng/ml BMP-2 in serumfreiem Medium als Positivkontrolle und serumfreiem Medium als Negativkontrolle durchgeführt. Die Auswertung erfolgte nach 2 Stunden bei jeweils drei Versuchsreihen.

Im folgenden sind die gemittelten und auf die Negativkontrolle normierten Ergebnisse graphisch dargestellt (Abb.12).

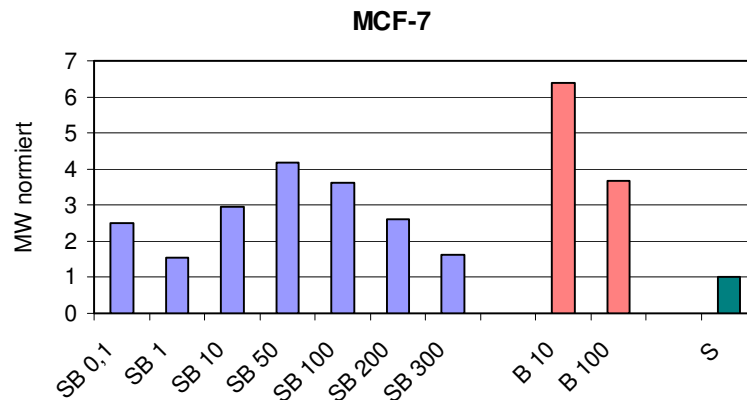


Abb.12: Graphische Darstellung der gemittelten und normierten Ergebnisse des Boyden Chamber Invasionsassays der Zelllinie MCF-7 bei Auswertung nach zwei Stunden und vorheriger fünfstündiger Inkubation mit 0,1; 1; 10; 50; 100; 200; 300 ng BMP-2 in SK-BR-3-Medium (SB), 10ng und 100ng BMP-2 in serumfreiem Medium als Positivkontrolle (B) und serumfreiem Medium als Negativkontrolle (S).

Es zeigte sich, dass im Vergleich zur Positivkontrolle die kombinierte Inkubation von BMP-2 und SK-BR-3-Überständen eine deutliche Minderung der unter Einfluß von BMP-2 gesteigerten Invasivität der Zellen zur Folge hat.

Eine gewisse Konzentrationsabhängigkeit der Mengen an zugegebenem BMP-2 mit einem Maximum bei 50 ng läßt sich hier vermuten.

Zusammenfassend für die Invasions- und Migrationsversuche läßt sich sagen, dass BMP-2 eine chemoattraktive Wirkung auf die Zelllinien T-47-D, BT-474, BT-20 und MCF-7 hat und die Inkubation der Zellen mit BMP-2 zu einer Erhöhung der Invasivität der Zelllinien T-47-D, BT-474, BT-20, SK-BR-3 und MCF-7 führt.

Dies war Grundlage für den dritten Teil der Studie, der sich mit dem molekularbiologischen Hintergrund einer erhöhten Migration und Invasion der Zellen durch BMP-2 auf der Ebene der Genexpression beschäftigte.

4.3 c-DNA-Microarray

Nach der 3-Schritt-Hypothese zur Invasion stellen Zelladhäsion, lokale Proteolyse und subsequent Migration die Schlüsselschritte der Überwindung von Basalmembran und Bindegewebe und somit der Metastasierung von Tumoren dar (Stettler-Stevenson, 1993). Aufgrund dieser pathobiologischen Zusammenhänge wurde nun das Expressionsmuster von verschiedenen Proteasen unter Einfluß von BMP 2 untersucht.

Mit Hilfe eines c-DNA-Microarrays wurde die Expression von 80 Proteasen in der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 nach 5-stündiger und 24-stündiger Inkubation mit BMP-2 im Vergleich zur serumfreien Kontrolle untersucht. Dabei wurde das in den Vorversuchen vermutete Wirkungsmaximum von 50 ng/ml BMP-2 eingesetzt. Außerdem wurde eine Nullkontrolle, d.h. ein Array ohne jegliche Inkubation und somit einem Mediumwechsel weniger, gemacht. Die Versuche wurden jeweils zweimal durchgeführt.

Die repräsentierten Gene und deren Belegplan auf dem c-DNA-Microarray sind in Tabelle 2 dargestellt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ADAM 8	ADAM 9	Cathep. B	Cathep. F	MMP 1	TIMP 1	MT2- MMP	Caspa.1	Integrin α 2	Integrin β 1	β -Aktin	
B	ADAM 9	ADAM 8	Cathep. F	Cathep. B	TIMP 1	MMP 1	Caspa. 1	MT2- MMP	Integrin β 1	Integrin α 2	β -Aktin	
C	ADAM 10	ADAM 11	Cathep. D	Cathep. H	MMP 2	TIMP 2	MT3- MMP	Caspa.2	Integrin α 4	Integrin β 2		
D	ADAM 11	ADAM 10	Cathep. H	Cathep. D	TIMP 2	MMP 2	Caspa. 2	MT3- MMP	Integrin β 2	Integrin α 4		
E	ADAM 15	TACE	Cathep. K	Cathep. L	MMP 3	TIMP 3	MT4- MMP	Caspa. 3	Integrin α 5	Integrin β 3	GAPDH	
F	TACE	ADAM 15	Cathep. L	Cathep. K	TIMP 3	MMP 3	Caspa. 3	MT4- MMP	Integrin β 3	Integrin α 5	GAPDH	
G	ADAM 20	ADAM 21	Cathep. S	Cathep. V	MMP 7	TIMP 4	MT5- MMP	Caspa. 4	Integrin α 6	Integrin β 4		
H	ADAM 21	ADAM 20	Cathep. V	Cathep. S	TIMP 4	MMP 7	Caspa. 4	MT5- MMP	Integrin β 4	Integrin α 6		
I	uPA	EF 1 α	Cathep. W	Cathep. Z	MMP 9	GFP	MMP 19	Caspa. 6	Integrin α V	Integrin β 5		
J	EF 1 α	uPA	Cathep. Z	Cathep. W	GFP	MMP 9	Caspa. 6	MMP 19	Integrin β 5	Integrin α V		
K	u PAR	PAI-1	Cystat. A	Cystat. B	MMP 11	Ubiquit	Caspa. 8	Caspa. 7	Integrin α V	Integrin β 7		
L	PAI-1	u PAR	Cystat. B	Cystat. A	Ubiquit	MMP 11	Caspa. 7	Caspa. 8	Integrin β 7	Integrin α V		
M	Emmpr	PAI-2	Cystat. C	Tissue factor	MMP 13	Heparan ase	Caspa. 9	Caspa. 10	rS9			
N	PAI-2	Emmpr	Tissue factor	Cystat. C	Heparan ase	MMP 13	Caspa. 10	Caspa. 9	rS9			
O	Emmpr II	c-ets-1	Pro 1073	Granz H	MT1- MMP	Bikunin	IAP 3	CEA	R 13 a			
P	c-ets-1	Emmpr II	Granz H	Pro 1073	Bikunin	MT1- MMP	CEA	IAP 3	R 13 a			

Tab. 2: Belegplan der Gene der Proteasen des verwendeten cDNA-Microarrays
Cathep.: Cathepsin, **Cystat.:** Cystatin, **Caspa.:** Caspase, **Emmpr:** Emmprin, **Ubiquit:** Ubiquitin.

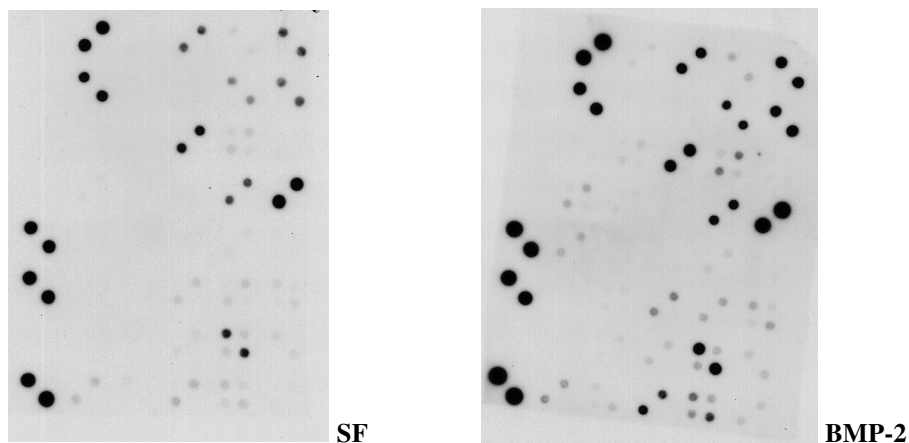


Abb.13: c-DNA-Microarray; beispielhafte Darstellung des eingescannten Chips eines Versuchs nach 5-stündiger Inkubation der Zelllinie MCF-7 mit 50 ng BMP-2 (rechts) bzw. der serumfreien Kontrolle (links).

In Abbildung 13 sind zwei repräsentative Arrays nach Inkubation der Zellen mit serumfreiem Medium und BMP-2 dargestellt. Die rein optische Auswertung dieser Chips ist aufgrund der z.T. nur minimalen Intensitätsunterschiede und der interexperimentellen Unterschiede in der Expressionsstärke der Gene nicht möglich.

Daher wurde zur rechnerischen Auswertung das Computerprogramm AIDA, Raytest GmbH, verwendet. Die Rohdaten wurden hinsichtlich der Hintergrundintensitäten korrigiert und die Mittelwerte von zwei korrespondierenden Signalen wurden berechnet. Um die Vergleichbarkeit unabhängiger Experimente herzustellen, wurden die Werte auf die Referenzgene, die sogenannten „housekeeping genes“ β -Aktin, GAPDH, R13a und rS9, normalisiert.

Leider konnten aufgrund von Verschmutzungen einiger Filter nicht alle Gene in beiden Versuchsreihen beurteilt werden, da eine genaue Messung der Expressionsstärke aufgrund der Verfärbungen des Hintergrundes nicht möglich war. Daher fehlen in den folgenden Auswertungen einige Werte.

Bei dem Großteil der untersuchten Gene fanden sich keine Veränderungen nach Inkubation mit BMP-2.

Bei einigen Genen jedoch konnte eine regulative Veränderung der Expression festgestellt werden. Voraussetzung waren vergleichbare Ergebnisse aus den

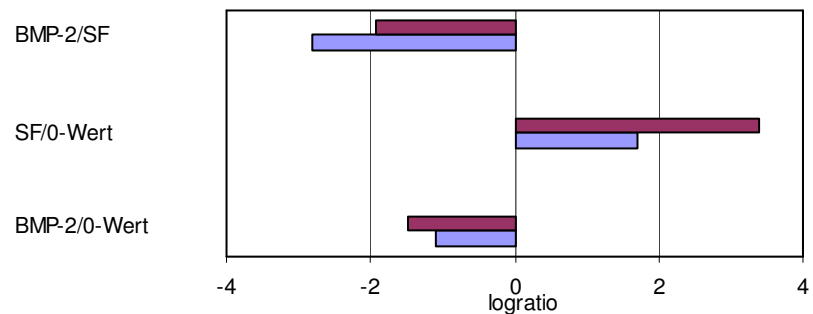
Doppelbestimmungen der korrespondierenden Punkte (jeweils zwei pro Versuch) sowie Änderungen der Genexpression in die gleiche Richtung bei den zwei Versuchen. Außerdem wurde eine Intensitätsänderung nach Bildung des logarithmierten Quotienten aus BMP-2 inkubierten und serumfreien Werten von $> 0,5$, d.h. eine Änderung um das etwa 1,5-fache, und eine Änderung des Ranges um > 2 vorausgesetzt. Die Einzelwerte der reproduzierbar veränderten Gene sowie einiger aufgrund der in der Literatur beschriebenen Daten ausgewählter Gene sind im Anhang aufgeführt.

Im folgenden sind die Ergebnisse dieser ausgewählten Gene graphisch dargestellt.

Dabei wurden zunächst die 5-stündige Inkubation mit BMP-2 mit der jeweiligen Serumfreikontrolle sowie der 0-Stunden Serumfreikontrolle verglichen (Abb.14).

Cathepsin B

5h Inkubation



Cathepsin D

5h Inkubation

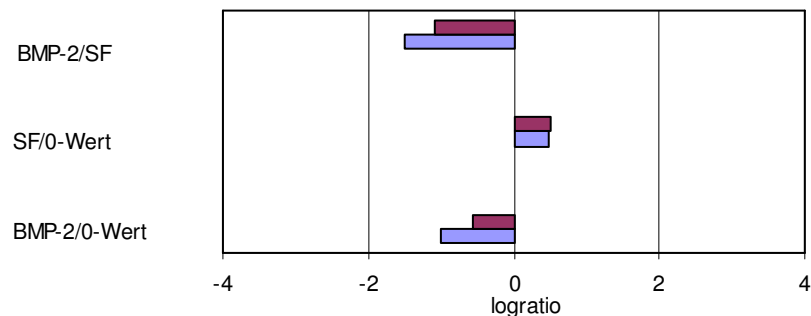


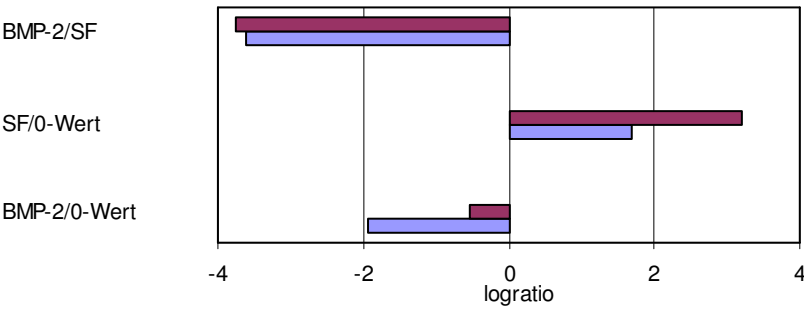
Abb.14: Graphische Darstellung der Veränderung der Expression der Gene Cathepsin B, D, H, K, Cystatin C, Caspase 7 und Integrin $\beta 4$ nach 5-stündiger Inkubation mit BMP-2 im Vergleich zur serumfreien Inkubation bzw. im Vergleich zur 0-Stunden Serumfreikontrolle.

■ Versuch 1 ■ Versuch 2

Fortsetzung Abb. 14:

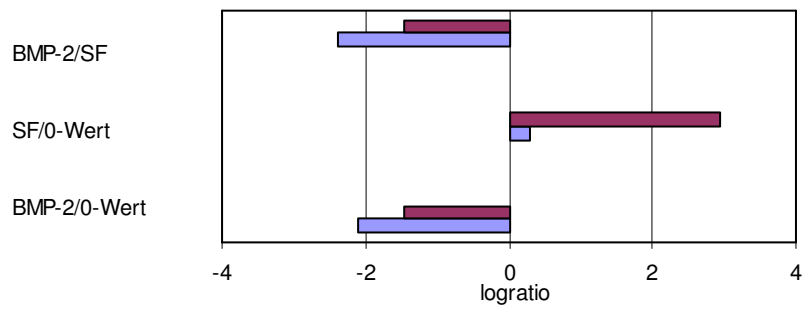
Cathepsin H

5h Inkubation



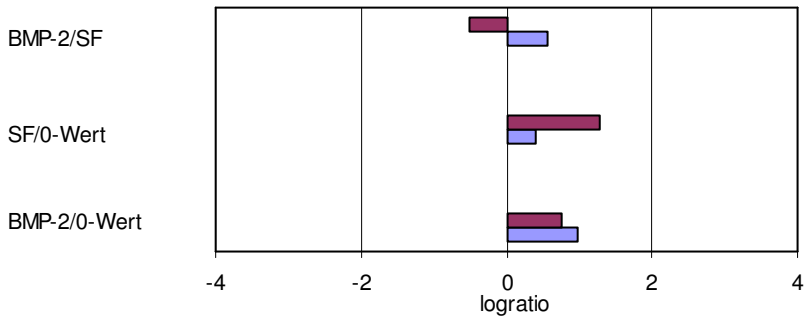
Cathepsin K

5h Inkubation



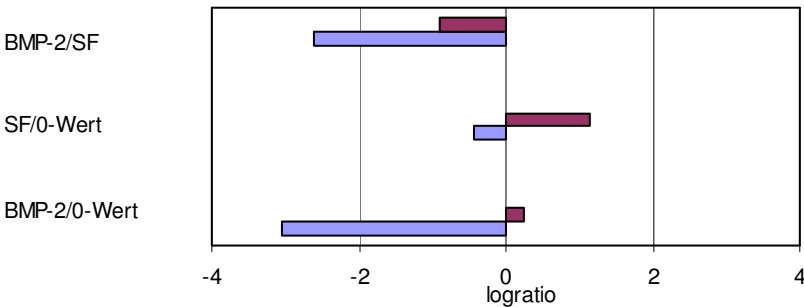
Cystatin C

5h Inkubation



Caspase 7

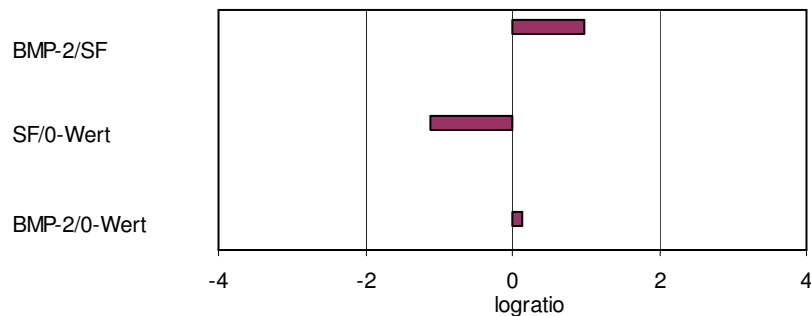
5h Inkubation



Fortsetzung Abb. 14:

Integrin $\beta 4$

5h Inkubation



Die hier dargestellten Grafiken enthalten jeweils drei Werte in zweifacher Versuchsausführung. Der unterste Wert stellt den logarithmierten Quotienten der aus dem Proteasenchip ermittelten Expressionswerte der einzelnen Gene nach 5-stündiger Inkubation mit BMP-2 und 0-stündiger serumfreier Inkubation dar. Der mittlere Wert ist der logarithmierte Quotient der 5-stündigen serumfreien Inkubation und der 0-stündigen Serumfreikontrolle. Beim obersten wurde der logarithmierte Quotient aus den Werten nach 5-stündiger Inkubation mit BMP-2 und nach 5-stündiger serumfreier Inkubation gebildet.

Bei Cathepsin B, D, H und K sieht man deutlich, dass die Expression nach 5-stündiger Inkubation mit BMP-2 im Vergleich zur Nullkontrolle erniedrigt war. Eine 5-stündige Inkubation mit serumfreiem Medium führte zu einer verstärkten Expression im Vergleich zur Nullkontrolle. Beim Vergleich der Werte nach 5-stündiger Inkubation mit BMP-2 bzw. serumfreiem Medium wird daher eine umso stärkere Suppression der Gene deutlich.

Bei Cystatin C fanden sich in den zwei Versuchen widersprüchliche Ergebnisse einer Hoch- bzw. Runterregulation nach BMP-2 Inkubation im Vergleich zur serumfreien Kontrolle. Im Vergleich zur Nullkontrolle war die Expression der BMP-2 inkubierten Gene beidesmal erhöht, allerdings variierte die Regulation nach serumfreier Inkubation. Aufgrund der erhöhten Expression nach 5-stündiger serumfreier Inkubation im 2. Versuch, ist die relative Erhöhung der 5-stündigen BMP-2 Inkubation im Vergleich zur 5-stündigen serumfreien Inkubation negativ. Eine relativ geringe Erhöhung der

Expression nach 5-stündiger serumfreier Inkubation im Vergleich zur Nullkontrolle führt daher zu einer im Vergleich der 5-Stunden Werte erhöhten Expression nach Inkubation mit BMP-2.

Im Fall von Caspase 7 war die Expression beim Vergleich der 5-stündigen BMP-2 Inkubation mit der 5-stündigen serumfreien Inkubation - trotz vermeintlicher Erhöhung nach BMP-2 Inkubation im Vergleich zur Nullkontrolle - immer erniedrigt, da die Hoch- bzw. Runterregulation jeweils hinter der vergleichbaren 5-stündigen Inkubation mit serumfreiem Medium zurückblieb.

Integrin β 4 wurde nach 5-stündiger Inkubation mit BMP-2 im Vergleich zur 5-stündigen serumfreien Kontrolle hochreguliert. Die Veränderung ist im Vergleich zur Nullkontrolle nicht so deutlich, jedoch bewirkte die 5-stündige serumfreie Inkubation eine deutliche Reduktion der Expression.

Die Auswertung der Daten nach 24-stündiger Inkubation mit BMP-2 im Vergleich zur jeweiligen serumfreien Kontrolle sowie der 0-Stunden Kontrolle erbrachte folgende Ergebnisse (Abb.15).

Cathepsin B

24h Inkubation

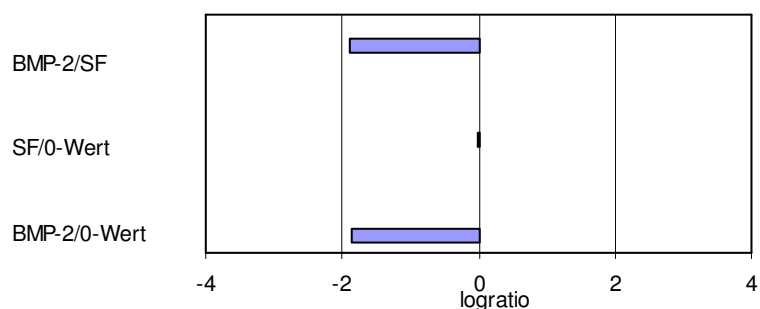


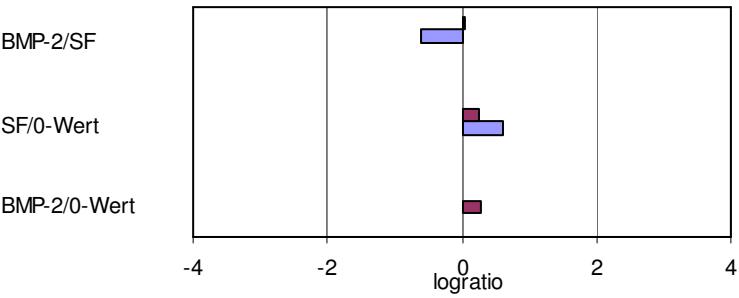
Abb.15: Graphische Darstellung der Veränderung der Expression der Gene Cathepsin B, D, H, K, Cystatin A und C, Caspase 7 und Integrin β 4 und β 5 nach 24-stündiger Inkubation mit BMP-2 im Vergleich zur serumfreien Inkubation bzw. im Vergleich zur 0-Stunden Serumfreikontrolle.

■ Versuch 1 ■ Versuch 2

Fortsetzung Abb. 15:

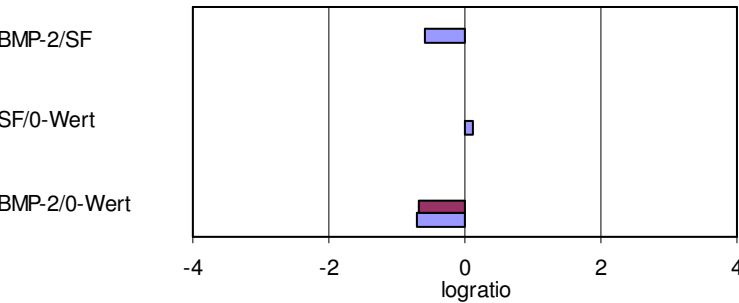
Cathepsin D

24h Inkubation



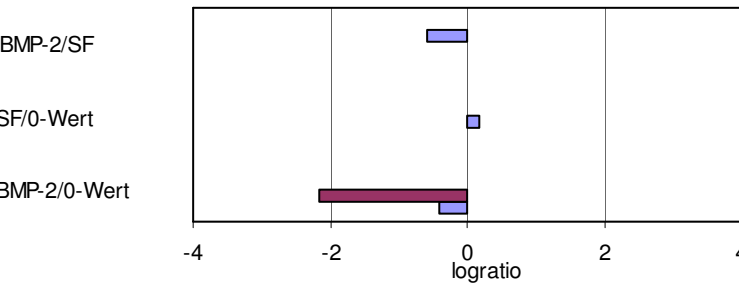
Cathepsin H

24h Inkubation



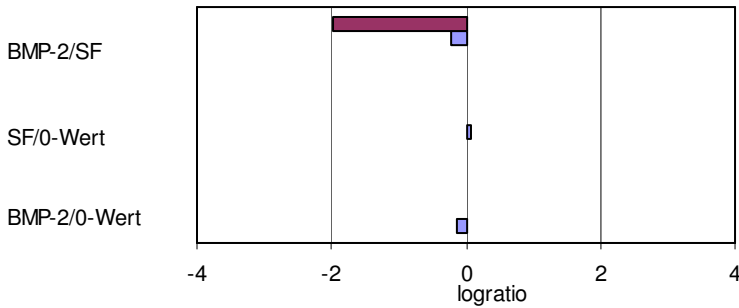
Cathepsin K

24h Inkubation



Cystatin A

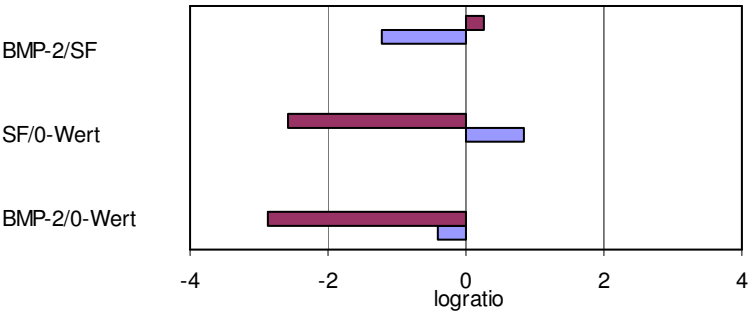
24h Inkubation



Fortsetzung Abb. 15:

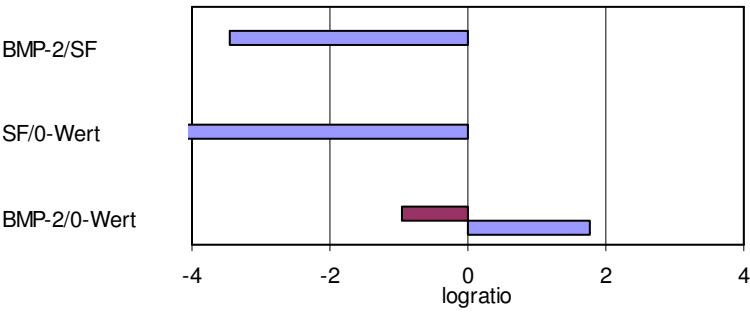
Cystatin C

24h Inkubation



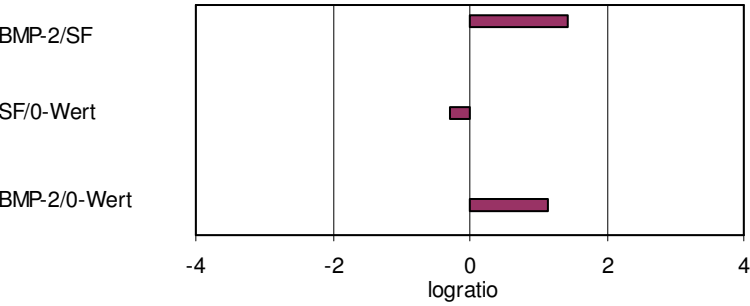
Caspase 7

24h Inkubation



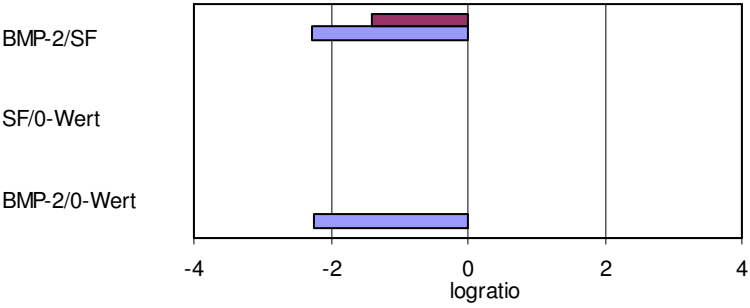
Integrin β 4

24h Inkubation



Integrin β 5

24h Inkubation



Die hier dargestellten Grafiken enthalten wieder jeweils drei Werte in zweifacher Versuchsausführung. Der unterste Wert stellt den logarithmierten Quotienten der aus dem Proteasenchip ermittelten Expressionswerte der einzelnen Gene nach 24-stündiger Inkubation mit BMP-2 und 0-stündiger serumfreier Inkubation dar. Der mittlere Wert ist der logarithmierte Quotient der 24-stündigen serumfreien Inkubation und der 0-stündigen Serumfreikontrolle. Beim obersten wurde der logarithmierte Quotient aus den Werten nach 24-stündiger Inkubation mit BMP-2 und nach 24-stündiger serumfreier Inkubation gebildet.

Bei Cathepsin B, H und K sieht man deutlich, dass die Expression nach 24-stündiger Inkubation mit BMP-2 im Vergleich zur Nullkontrolle erniedrigt war. Cathepsin D war hingegen nicht verändert bzw. leicht erhöht. Eine 24-stündige Inkubation mit serumfreiem Medium führte bei Cathepsin D, H und K zu einer leicht erhöhten Expression im Vergleich zur Nullkontrolle, bei Cathepsin B war diese leicht erniedrigt. Beim Vergleich der Werte nach 24-stündiger Inkubation mit BMP-2 bzw. serumfreiem Medium wurde bei Cathepsin B, H, K und im ersten Versuch von Cathepsin D eine supprimierte Expression gefunden. Im zweiten Versuch von Cathepsin D war dies nicht reproduzierbar.

Die Expression von Cystatin A war nach 24-stündiger Inkubation mit BMP-2 im Vergleich zur 24-stündigen Serumfreikontrolle supprimiert. Wieder fanden sich erhöhte Expression nach 24-stündiger serumfreier Inkubation im Vergleich zur Nullkontrolle und erniedrigte Expression nach 24-stündiger Inkubation mit BMP-2 im Vergleich zur Nullkontrolle.

Bei Cystatin C fanden sich in den zwei Versuchen widersprüchliche Ergebnisse einer Hoch-

bzw. Runterregulation nach BMP-2 Inkubation. Im Vergleich zur Nullkontrolle war die Expression der BMP-2 inkubierten Gene beidesmal erniedrigt, allerdings variierte die Regulation nach serumfreier Inkubation. Im ersten Versuch war die 24-stündige serumfreie Inkubation erhöht, was zu einer Suppression von Cystatin C beim Vergleich der 24-stündigen Inkubation von BMP-2 mit der 24-stündigen serumfreien Inkubation führt. Aufgrund der stark erniedrigten Expression nach 24-stündiger serumfreier

Inkubation im 2. Versuch, ist die Expression der 24-stündigen BMP-2 Inkubation im Vergleich zur 24-stündigen serumfreien Inkubation leicht erhöht.

Im Fall von Caspase 7 war die Expression beim Vergleich der 24-stündigen BMP-2 Inkubation mit der 24-stündigen serumfreien Inkubation - trotz vermeintlicher Erhöhung nach BMP-2 Inkubation im Vergleich zur Nullkontrolle - erniedrigt, da die Suppression nach 24-stündiger serumfreier Inkubation im Vergleich zur Nullkontrolle die relative Hochregulation bei weitem überschritt.

Integrin β 4 wurde nach 24-stündiger Inkubation mit BMP-2 im Vergleich zur 24-stündigen serumfreien Kontrolle hochreguliert. Im Vergleich zur Nullkontrolle war die Expression ebenfalls erhöht. Die 24-stündige serumfreie Inkubation führte im Vergleich zur Nullkontrolle zu einer deutlichen Reduktion der Expression.

Bei Integrin β 5 fand sich eine Suppression nach 24-stündiger Inkubation mit BMP-2 im Vergleich zur 24-stündigen serumfreien Inkubation. Auch im Vergleich zur Nullkontrolle war die Expression nach Inkubation mit BMP-2 vermindert. Die 24-stündige serumfreie Inkubation führte nur zu einer geringen Erhöhung der Expression im Vergleich zur Nullkontrolle.

Tabelle 3 gibt einen Überblick über die Richtung der Regulation der Expression der genannten Gene nach Inkubation mit BMP-2 im Vergleich zur Inkubation mit serumfreiem Medium. Dabei wurde eine logratio von $> 0,5$ und ein rankchange von > 2 als minimale Änderung vorausgesetzt.

Genname	Inkub.zeit	1. Versuch	2. Versuch	reprod. Änderung
Cathepsin B	5h	-1	-1	▼
	24h	-1		(▼)
Cathepsin D	5h	-1	-1	▼
	24h	-1	0	
Cathepsin H	5h	-1	-1	▼
	24h	-1		(▼)
Cathepsin K	5h	-1	-1	▼
	24h	-1		(▼)
Cystatin A	5h			
	24h	0	-1	
Cystatin C	5h	1	-1	
	24h	-1	0	
Caspase 7	5h	-1	-1	▼
	24h	-1		(▼)
Integrin β4	5h		1	(▲)
	24h		1	(▲)
Integrin β5	5h			
	24h	-1	-1	▼

Tab. 3: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der cDNA-Microarrays mit Richtung der Genregulation von Cathepsin B, D, H und K, Cystatin A und C, Caspase 7, Integrin β 4 und β 5 nach 5- bzw. 24-stündiger Inkubation mit BMP-2.

Aus dieser Tabelle wird deutlich, dass die Cathepsine B, D, H und K nach 5-stündiger Inkubation mit BMP-2 runterreguliert werden. Nach 24-stündiger Inkubation kann dies nicht reproduzierbar gezeigt werden.

Für Cystatin A und C kann keine reproduzierbare Änderung der Expressivität festgestellt werden. Diese sind aufgrund ihrer antagonistischen Wirkung zu den Cathepsinen und den Beschreibungen in der Literatur in unsere Auswertung miteingegangen.

Caspase 7 wird nach 5-stündiger Inkubation mit BMP-2 runterreguliert. Nach 24-stündiger Inkubation kann keine Aussage gemacht werden.

Integrin β 4 wird nach 5- bzw. auch nach 24-stündiger Inkubation mit BMP-2 hochreguliert. Leider fehlen auch hier aufgrund technischer Schwierigkeiten (s.o.) die jeweiligen Wiederholungen.

Integrin β 5 wird nach 5-stündiger Inkubation mit BMP-2 nicht messbar verändert exprimiert und nach 24-stündiger Inkubation runterreguliert.

Aufgrund der aus Kostengründen limitierten Anzahl an Wiederholungen, sind diese Aussagen nicht statistisch signifikant, sondern lediglich richtungsweisend für Folgeexperimente.

4.4 PCR-Daten

Aufgrund der starken Varianz der Ergebnisse und der kleinen Anzahl an Experimenten des cDNA-Microarrays kann dieser nur als Screeningmethode angesehen werden. Daher wurde nun die Genexpression ausgewählter Proteasen, bei denen eine deutliche Änderung der Expression im Proteasenchip festgestellt wurde, mit RT-PCR untersucht, um die Reproduzierbarkeit dieser Ergebnisse durch eine zweite, unabhängige Methode zu prüfen.

Die Vorbereitung der MCF-7 Zellen erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie bei der Arraymethode. Die Zellen wurden jeweils 5 bzw. 24 Stunden mit 50 ng BMP-2 bzw. mit serumfreiem Medium inkubiert.

Die PCR erfolgte mit Primern folgender Proteasen: Cathepsin B, Cathepsin D, Cathepsin H, Cathepsin K, Cystatin A, Cystatin C, Caspase 7, Integrin beta 4 und Integrin beta 5.

Die Versuche wurden jeweils zweimal durchgeführt.

Nachweis und Analyse der PCR-Produkte erfolgten mittels eines Agarose-Gellaufs. Nach der Gelelektrophorese erfolgte die Dokumentation der Banden mit einem Videokamera-gestütztem Computersystem. Die Intensität der Banden als Maß für den mRNA-Gehalt wurde densitometrisch mit dem Programm LabImage bestimmt. Die so

gewonnenen Werte wurden mit Hilfe einer Eichkurve korrigiert und anschließend auf den jeweiligen, ebenfalls korrigierten Aktin-Wert bezogen. Dies erlaubte einen direkten Vergleich der unterschiedlichen Versuche. Veränderungen der Genexpression nach Inkubation mit BMP-2 für 5 bzw. 24 Stunden konnten gegenüber der serumfreien Probe ermittelt werden, indem aus den auf den β -Aktin-mRNA-Gehalt gemittelten Werten ein Quotient Q wie folgt gebildet wurde:

$$Q = \frac{\text{mRNA – Level in Arbitrary Units mit BMP – 2 Inkubation}}{\text{mRNA – Level in Arbitrary Units ohne BMP – 2 Inkubation}}$$

Bei einer Zunahme des mRNA-Gehaltes in der inkubierten Kultur gegenüber der serumfreien Kontrollkultur ergab sich ein $Q > 1$, wohingegen $Q < 1$ für eine Verringerung des mRNA-Gehaltes durch die Inkubation sprach. Ein Quotient $Q = 1$ sprach für keinen messbaren Unterschied zwischen dem mRNA-Level der inkubierten Kultur im Vergleich zur Kontrollkultur.

Die Einzelwerte sind im Anhang tabellarisch aufgeführt. Die folgenden Grafiken zeigen die gelelektrophoretisch aufgetrennten PCR-Produkte und die Ergebnisse der PCR-Daten nach Auswertung der Banden mit dem Programm LabImage und Normalisierung der Absolutwerte auf Aktin (Abb.16). Dargestellt sind die Quotienten aus Inkubation mit BMP-2 und serumfreier Inkubation für 5 bzw. 24 Stunden der zwei Versuchsreihen. Dabei wurde eine minimale Änderung der Expression, d.h. Regulation von BMP-2, von 5 % (0,05) festgesetzt.

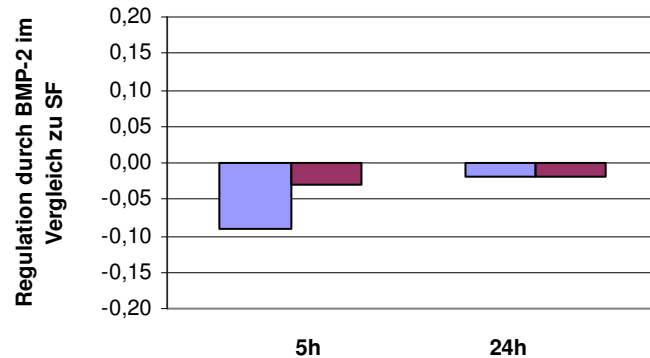
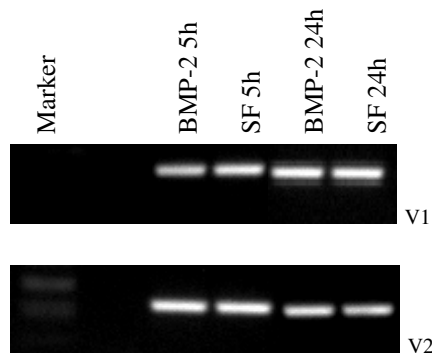
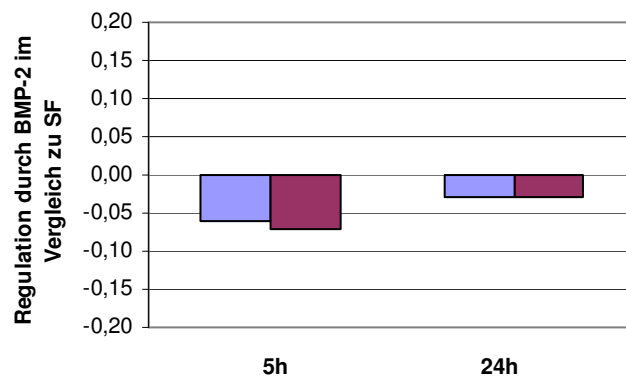
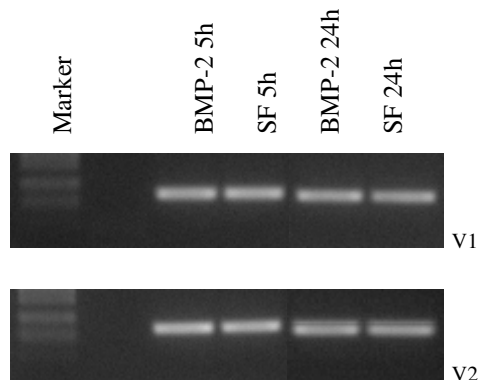
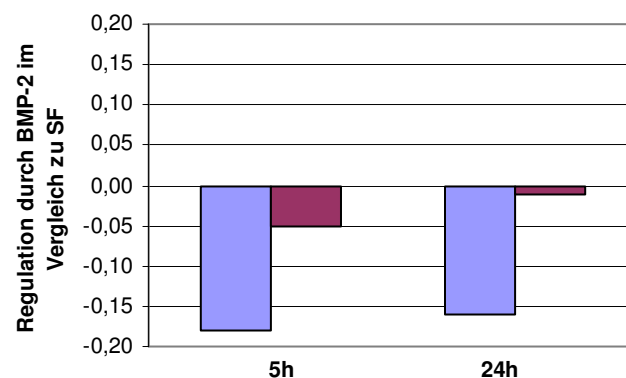
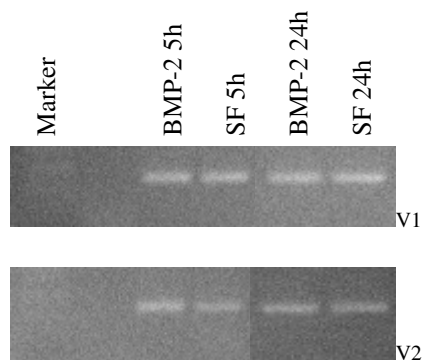
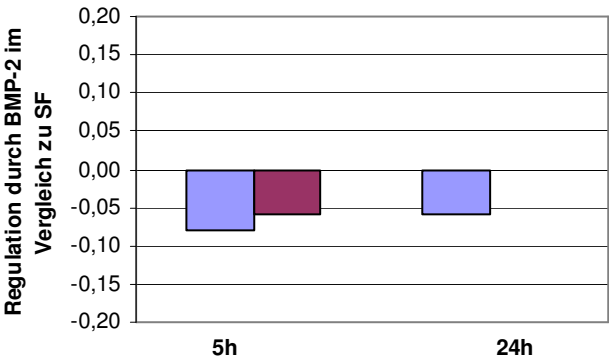
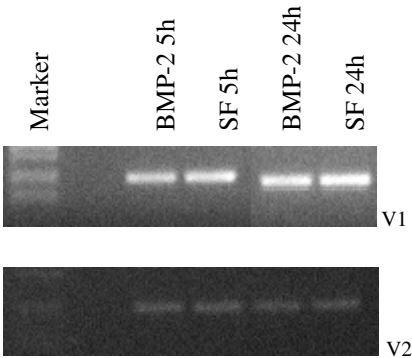
Cathepsin B**Cathepsin D****Cathepsin H**

Abb.16: Gelläufe der PCR-Produkte von Cathepsin B, D, H und K, Cystatin A und C, Caspase 7, Integrin β 4 und β 5 und Aktin und graphische Darstellung der mit dem Programm LabImage ausgewerteten und auf Aktin korrigierten Ergebnisse für die untersuchten Proteasen. Dargestellt sind die Quotienten aus Inkubation mit BMP-2 über 5 bzw. 24 Stunden und serumfreier Probe.

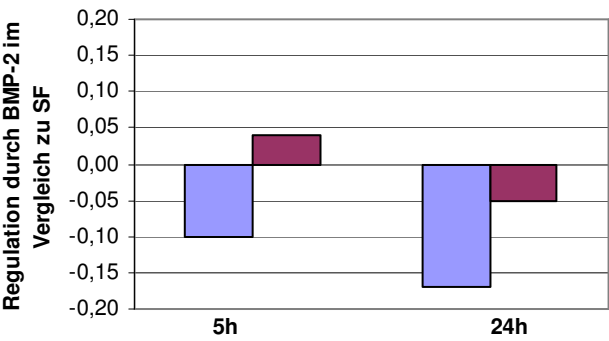
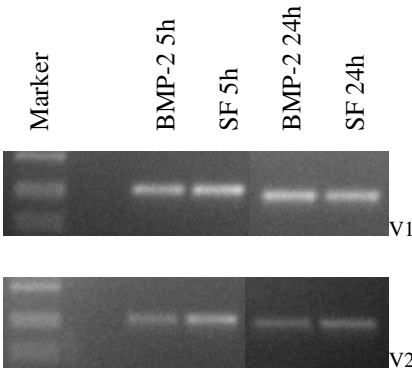
■ Versuch 1 (V1) ■ Versuch 2 (V2)

Fortsetzung Abb.16:

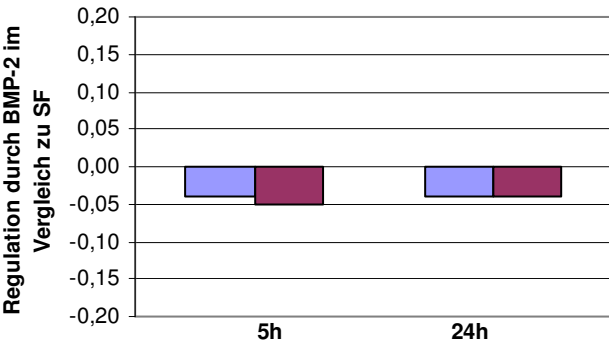
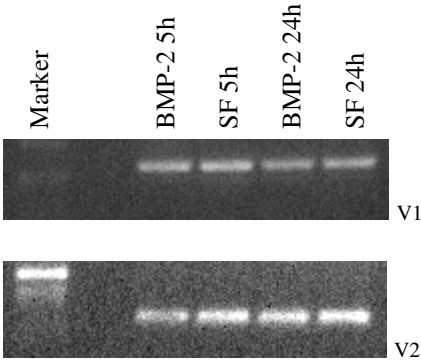
Cathepsin K



Cystatin A

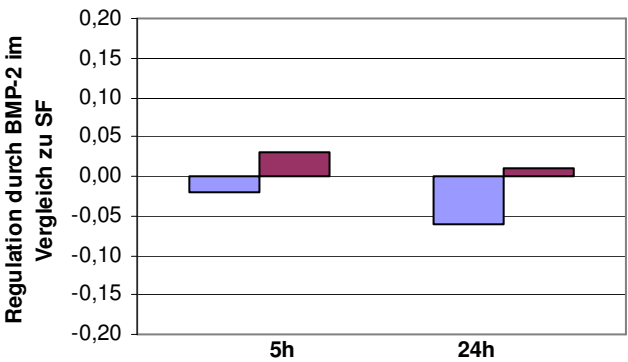
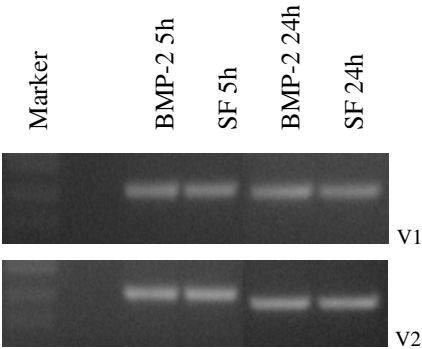


Cystatin C

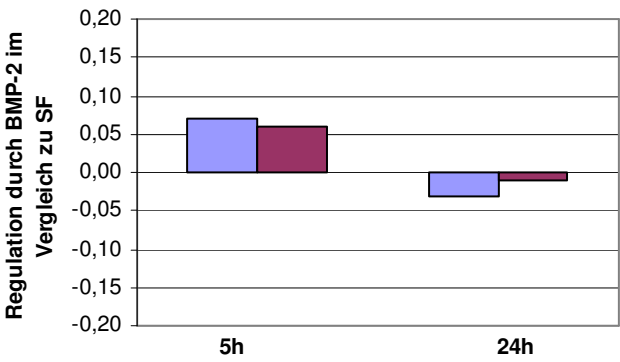
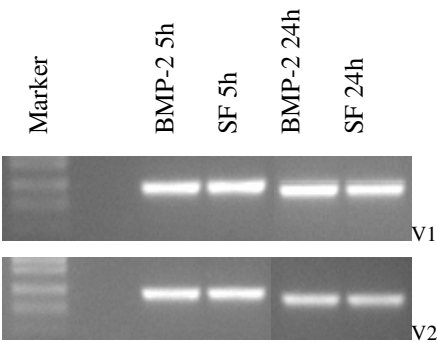


Fortsetzung Abb.16:

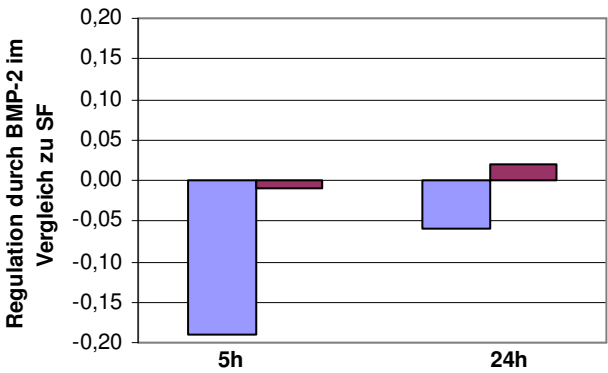
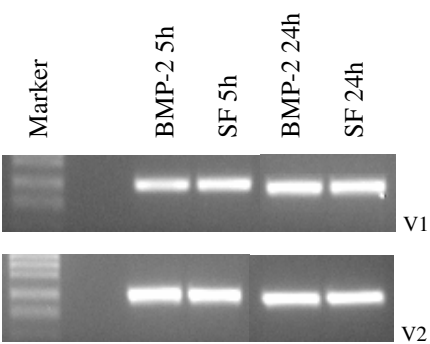
Caspase 7



Integrin $\beta 4$

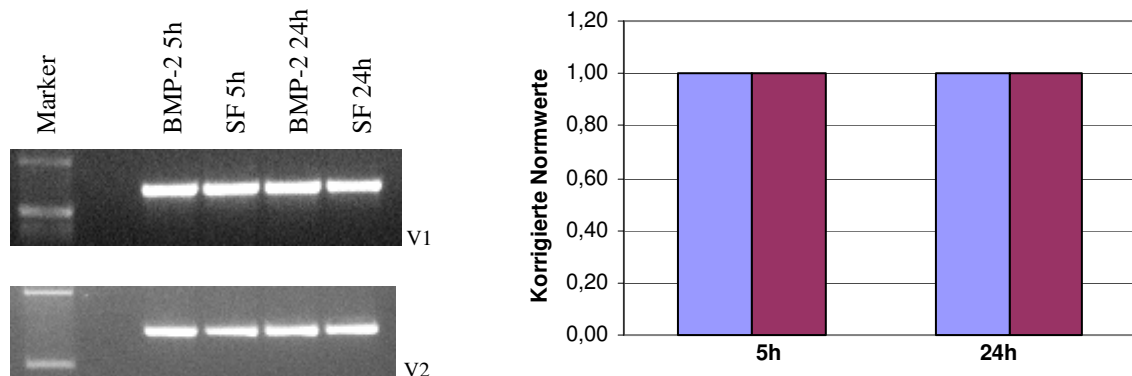


Integrin $\beta 5$



Fortsetzung Abb.16:

Aktin



Da die Versuche jeweils nur zweimal durchgeführt wurden, ist eine Standardabweichung bzw. eine Signifikanz auch hier nicht zu berechnen. Wir legten daher eine minimale Änderung des mRNA-Gehaltes, mit anderen Worten der Genexpression, von > 5 % (0,05) fest.

Daraus ergab sich für die Cathepsine D, H und K eine deutliche Verminderung des mRNA-Gehaltes nach 5-stündiger Inkubation mit BMP-2. Bei Cathepsin B konnte die gefundene Verminderung im 2. Versuch nicht reproduziert werden. Nach 24-stündiger Inkubation konnten jeweils im ersten Versuch verminderte RNA-Level bei Cathepsin H und K gezeigt werden. Dies ließ sich im zweiten Versuch wie auch für die Gene Cathepsin B und D nicht bestätigen.

Cystatin A fanden wir im ersten Versuch sowohl nach 5-stündiger als auch nach 24-stündiger Inkubation mit BMP-2 erniedrigt. Die Wiederholung konnte eine Veränderung > 5 % weder für 5 noch für 24 Stunden zeigen. Auch für Cystatin C konnten mittels PCR kein veränderter RNA-Gehalt nach Inkubation mit BMP-2 nachgewiesen werden.

Für Caspase 7 ließen sich erniedrigte RNA-Level nur im ersten Versuch nach 24-stündiger Inkubation mit BMP-2 zeigen. Die Wiederholung und die Auswertung der 5-Stunden-Werte zeigten keine eindeutigen Veränderungen.

Eine reproduzierbare Erhöhung des mRNA-Gehaltes nach 5-stündiger Inkubation mit BMP-2 fanden wir für Integrin β 4. Nach 24 Stunden fanden wir nach den von uns festgelegten Kriterien keine Veränderungen mehr.

Integrin β 5 zeigte in den ersten Versuchen eine Verminderung der RNA-Level. Dies konnte jedoch weder für die 5 noch für die 24 Stunden Inkubation reproduziert werden.

Tabelle 4 gibt einen Überblick über die Richtung der Regulation der Expression der genannten Gene nach Inkubation mit BMP-2.

Genname	Inkub.zeit	1. Versuch	2. Versuch	reprod. Änderung
Cathepsin B	5h	-1	0	
	24h	0	0	
Cathepsin D	5h	-1	-1	▼
	24h	0	0	
Cathepsin H	5h	-1	-1	▼
	24h	-1	0	
Cathepsin K	5h	-1	-1	▼
	24h	-1	0	
Cystatin A	5h	-1	0	
	24h	-1	0	
Cystatin C	5h	0	0	
	24h	0	0	
Caspase 7	5h	0	0	
	24h	-1	0	
Integrin β4	5h	1	1	▲
	24h	0	0	
Integrin β 5	5h	-1	0	
	24h	-1	0	

Tab. 4: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der PCR-Versuche mit Richtung der Genregulation von Cathepsin B, D, H und K, Cystatin A und C, Caspase 7, Integrin β 4 und β 5 nach 5- bzw. 24-stündiger Inkubation mit BMP-2.

Die Tabelle zeigt, dass Cathepsin D, H und K nach 5-stündiger Inkubation mit BMP-2 im Vergleich zur serumfreien Kontrolle reproduzierbar runterreguliert werden und Integrin β 4 nach 5-stündiger Inkubation mit BMP-2 hochreguliert wird. Für die anderen Gene bzw. anderen Inkubationszeiten kann aufgrund fehlender Reproduzierbarkeit der Ergebnisse keine Aussage getroffen werden.

Zusammenfassend lässt sich für die c-DNA-Microarray und PCR-Daten sagen, dass die Inkubation mit BMP-2 bei dem Großteil der untersuchten Proteasen zu keiner signifikanten Änderung der Expressionsstärke führt. Die Proteasen Cathepsin D, H und K sowie Integrin β 4 finden sich dennoch reproduzierbar verändert. Die biologische Wertigkeit dieser Daten wird im folgenden diskutiert.

5. DISKUSSION

Ziel der Untersuchungen war zum einen die Funktion von BMP-2, welches eine verstärkte Expression in verschiedenen Tumorgeweben im Vergleich zum korrespondierenden Normalgewebe zeigt, hinsichtlich des komplexen Geschehens der Metastasierung weiter zu erklären, zum anderen aber auch den molekularbiologischen Hintergrund bzw. die Wirkungsweise hinsichtlich der Beteiligung von Proteasen zu erforschen.

Wie in der Einleitung beschrieben, ist die Entstehung bzw. die Progression von Tumoren ein mehrschrittiger Prozeß, der Mutation und Selektion von Zellen mit gesteigerter Kapazität für

Proliferation, Überleben und Metastasierung umfaßt. Von besonderer Bedeutung speziell für die Bildung von Tochtergeschwüren sind dabei die Migration und die Invasion von Tumorzellen. Am Anfang der metastatischen Kaskade steht die Tumorzellmigration, durch die die Zellen ihren Ursprungsort verlassen können und Zugang zum Lymphsystem bzw. Blutkreislauf bekommen. Um die Vorwärtsbewegung zu erreichen, koppeln die Zellen lokale Proteolyse mit koordinierter und zeitlich limitierter Adhäsion und Deadhäsion. Dies wird durch verschiedene Wachstumsfaktoren, u.a. auch BMP-2, vermittelt und durch die Wirkung verschiedener Proteasen mitrealisiert. Diese fördern nicht nur Wachstum und Motilität der Zellen sondern auch Invasion durch Lyse extrazellulärer Matrixkomponenten. Außerdem wirken sie bei der Angiogenese mit und spielen eine maßgebliche Rolle bei der Verhinderung der Apoptose, dem programmierten Zelltod.

In unseren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass BMP-2 sowohl die Migration als auch die Invasivität von Brustkrebszellen *in vitro* steigert.

BMPs sind bereits als chemoattraktive Faktoren für viele Zelltypen, z. B. Monozyten, Osteoblasten, Lungenkrebszellen, etc., beschrieben worden (Cunningham et al., 1992; Lind et al., 1996; Langenfeld et al., 2003). Wir konnten zeigen, dass Zellen der

Brustkrebszelllinien MCF-7, BT-20, BT-474 und T-47-D unter Einfluß von BMP-2 in vitro stärker migrieren.

Am ausgeprägtesten war dies bei T-47-D und BT-20 festzustellen. Sogar im Vergleich zur Positivkontrolle war die chemotaktische Potenz unter Inkubation mit BMP-2 in den Zelllinien T-47-D, BT-474 und MCF-7 erhöht.

Dabei fiel auf, dass bei T-47-D die Wirkung von BMP-2 unabhängig von der Konzentration etwa gleich war. Bei BT-20 und MCF-7 konnte man eine deutliche Steigerung der Migration von 1 bis 50 ng/ml BMP-2 sehen. Im Gegensatz dazu fanden wir bei BT-474 die höchste migratorische Aktivität bei der niedrigsten Konzentration BMP-2, nämlich 1 ng/ml.

Das unterschiedliche Ansprechen auf verschiedene Konzentrationen des zugesetzten Wachstumsfaktors kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen ist die Eigenwanderung der Zelllinien unterschiedlich stark ausgeprägt und somit steigerungsfähig. Zum anderen ist die Rezeptorausstattung, d.h. Komposition, Präsenz an der Zelloberfläche und auch die Expression der BMP-Rezeptoren, verschieden (Nohe et al., 2002). Möglicherweise spielen auch Konkurrenzen um die Rezeptorbindung eine Rolle. Auch der Eigengehalt an BMP-2 ist sehr unterschiedlich, was ebenfalls Einfluß auf die Wirkung von künstlich zugesetztem BMP-2 haben könnte (Schwalbe et al., 2000).

Die ebenfalls untersuchte Zelllinie SK-BR-3 zeigte andere Ergebnisse. Es fanden sich im Vergleich zur Negativkontrolle eher erniedrigte Zellzahlen. Der promigratorische Einfluß von BMP-2 wurde für diese Zelllinie nicht bestätigt.

Möglicherweise produzieren SK-BR-3 Zellen einen antagonistischen Faktor, der die Wirkung von BMP-2 hemmt. Expressionsprofile von verschiedenen BMPs zeigten in der Zelllinie SK-BR-3 im Vergleich zu den anderen untersuchten Zelllinien eine erhöhte Expression von BMP-3 (Schwalbe et al., 2000). Eine gegensätzliche Wirkweise dieser beiden Wachstumsfaktoren wird in der Literatur vermutet. Daluiski et al. stellten die Hypothese auf, dass BMP-3 ein potentieller Antagonist von BMP-2 sein könnte (Daluiski et al., 2001). Ob BMP-3 verantwortlich für das veränderte Reaktionsverhalten von SK-BR-3 ist, ist jedoch noch nicht geklärt und zur Zeit Gegenstand weiterer Untersuchungen in unserem Labor.

Generell fanden wir eine breite Streuung der absoluten Zellzahlen bei der mikroskopischen Auswertung der Transwell-Migrations-Assays. Die unterschiedlichen Zellzahlen sprechen zum einen für die unterschiedliche chemotaktische Potenz der Zelllinien und der Fähigkeit zur Adhäsion an der Filtermembran, zum anderen aber auch für die versuchsbedingte Varianz der Ergebnisse, welche durch die Komplexität des Versuchsansatzes bedingt ist. Daher haben wir die Einzelergebnisse der einzelnen Versuchsreihen gemittelt und auf die Negativkontrolle normalisiert, um diese statistischen Fehler zu minimieren. Da aufgrund des zeitlichen Aufwands der Versuche nur drei Wiederholungen gemacht wurden, lassen sich keine statistischen Signifikanzen berechnen. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse auch vor dem Hintergrund früherer Untersuchungen in unserem Labor (unveröffentlichte Ergebnisse) sprechen jedoch für die Richtigkeit dieser Aussagen.

Der Einfluß von BMP-2 auf das invasive Potential der Zelllinien MCF-7, BT-20, BT-474, T-47-D und SK-BR-3 wurde mit dem Boyden Chamber Assay untersucht (Albini et al., 1987; Sieuwerts et al., 1997). Die Besonderheit bei diesem Versuchsansatz bestand darin, das rekombinante BMP-2 nicht wie von anderen Arbeitsgruppen praktiziert in der unteren Kammer zuzusetzen, sondern die Zellen mit diesem Wachstumsfaktor vorzuinkubieren. Dabei zeigte sich nach einer 5-stündigen Inkubation mit BMP-2 eine deutliche Steigerung der Invasivität der Zellen bei allen untersuchten Zelllinien.

Die Inkubation mit SK-BR-3-Überständen führte im Vergleich zur serumfreien Negativkontrolle nur zu einer geringen Erhöhung der Invasivität, die weit hinter der der serumhaltigen Positivkontrolle bzw. der Inkubation mit BMP-2 zurückblieb.

Die Ausnahme hierbei war BT-20, wo eine im Vergleich zur BMP-2-Inkubation relativ höhere Invasivität durch Inkubation mit SK-BR-3-Überständen erzielt wurde. Dies kann mehrere Ursachen haben. Zum einen sind SK-BR-3-Überstände ein sehr heterogenes Substanzgemisch, welches durchaus proinvasive Faktoren enthält, auf die die Zelllinien unterschiedlich ansprechen. Zum anderen hat BT-20 im Vergleich zu den anderen Zelllinien einen sehr hohen BMP-2 Gehalt, welcher die Empfindlichkeit gegenüber exogen zugeführtem rh-BMP-2 reduzieren kann. Dafür spricht auch, dass BT-20 die einzige Zelllinie in den Migrationsversuchen war, die unter BMP-2 keine höhere Migrationsrate als unter serumhaltigen Bedingungen zeigte. Außerdem zeigten schon

die Postivkontrollen mit serumhaltigem Medium einen sehr hohen Ausgangswert bei den Zelllinien BT-20 und SK-BR-3. Sie sind die aggressivsten verwendeten Zelllinien und haben per se ein sehr hohes Invasionspotential, das sich nur schwer steigern läßt.

Wie bei den Transwell-Migrations-Assays zeigten sich auch bei der mikroskopischen Auswertung der Boyden Chamber Membranen versuchsbedingt und durch die unterschiedliche Adhäsions- bzw. Invasionsfähigkeit der Zelllinien starke Schwankungen in Bezug auf die absoluten Zellzahlen. Dies wurde ebenfalls durch Mittelung der Einzelergebnisse und Normalisierung auf die Negativkontrolle versucht zu kompensieren.

Aufgrund der bei der Auswertung der Migrations-Assays aufgestellten Hypothese eines von der Zelllinie SK-BR-3 produzierten, antagonistisch zu BMP-2 wirkenden Faktors, führten wir zusätzlich zur Positiv- und Negativkontrolle eine weitere Inkubation durch. Dabei verwendeten wir von der Zelllinie SK-BR-3 nach 24-stündiger serumfreier Inkubation gewonnene Zellkulturüberstände. Bei allen Zelllinien zeigte sich eine im Vergleich zur Inkubation mit BMP-2 deutlich verminderte Invasivität der Zellen. Auch die Untersuchung der kombinierten Inkubation von SK-BR-3-Überständen mit BMP-2 zeigte eine deutliche Hemmung der durch alleinige Inkubation mit BMP-2 gesteigerten Invasivität.

Die Bedeutung dieser Ergebnisse und die Verfolgung der aufgestellten Hypothese eines von SK-BR-3 produzierten, BMP-2 antagonistischen Faktors bzw. dessen Identifizierung sind derzeit Bestandteil weiterer Untersuchungen in unserem Labor.

Die klinische Relevanz einer erhöhten Migrations- und Invasionsfähigkeit von Tumorzellen ist hinsichtlich der Ausbildung von Tochtergeschwüren unstrittig. Der Prozeß der Metastasierung ist allerdings bis heute nicht abschließend erklärt. Die Hydrolyse von extrazellulärer Matrix gilt als zentraler Mechanismus (Duffy, 1992; Edwards et Murphy, 1998; Sameni et al., 2000). Dabei wurden drei Gruppen von Proteinasen gefunden, v.a. Serin-, Thiol- und Metalloproteinasen, welche von Tumorzellen sezerniert werden und verantwortlich für die proteolytische Kaskade während der Invasion sind (Benitez-Bribiesca et al., 1995). Im Hinblick auf

Klassifikation, Prognose und Therapie maligner Tumoren sind diverse Proteasen nun Bestandteil zahlreicher Untersuchungen. Hier spielen vor allem Veränderungen der Expression und Aktivität der Proteasen und ihrer Inhibitoren in malignen Tumoren eine Rolle.

Dabei hat sich die Expressionsanalyse mittels cDNA-Microarrays als sehr wertvoll hinsichtlich der Tumorbiologie, des Phänotyp und der Prognose erwiesen (Hedenfalk et al., 2001; Sorlie et al., 2001; West et al., 2001; van't Veer et al., 2002;). Diese Technologie erlaubt einen schnellen Durchlauf vieler Gene mit wenigen Proben. Die Ergebnisse müssen allerdings durch andere Methoden bestätigt werden. Vor allem die Analyse der Daten bietet zahlreiche Fehlerquellen. Die optische Auswertung mit dem menschlichen Auge ist aufgrund der zum Teil sehr geringen Intensitätsunterschiede nicht möglich und daher einer Computersoftware überlassen, welche die Intensitäten der vom Scanner generierten Bilder misst. Störfaktoren, wie zum Beispiel unregelmäßige Färbung, d.h. Intensität, des Hintergrundes, z.B. durch Verunreinigungen der Filtermembranen, sind zu einem gewissen Teil zu berücksichtigen, aber nicht vollständig kompensierbar. Sensitivität und Spezifität der Microarraytechnologie sind im Großen und Ganzen gut. Die Zuverlässigkeit der Ergebnisse wurde durch Vergleichsuntersuchungen mit dem NorthernBlot bestätigt. Allerdings bleibt das Problem der Unterschätzung von Expressionswerten durch limitierte Detektion im Sättigungsbereich, sowie der nicht-linearen Bindungskurven der Proben (DeRisi et al., 1996; Cheung et al., 1999; Khan et al., 1999). Durch generell unterschiedliche Intensitätsniveaus der einzelnen Filter, muß eine Normalisierung z.B. auf Referenzgene, sogenannte „housekeeping genes“, erfolgen, um die Ergebnisse der einzelnen Versuche vergleichen zu können (Gerhold et al., 1999). Außerdem werden post-translationale Modifikationen, welche die Proteinexpression und –funktion beeinflussen, bei der RNA-Expressionsanalyse nicht berücksichtigt (Korkola et al., 2003). Neben diesen wissenschaftlichen Grenzen dieser Methode sind auch die Kosten als limitierender Faktor zu erwähnen (Kurian et al., 1999).

Wir haben in Zusammenarbeit mit dem Institut für Biochemie das Expressionsmuster von 80 verschiedenen Proteasen mit dem Proteasen-cDNA-Microarray untersucht. Dabei verwendeten wir Zellen der Mammakarzinomzelllinie MCF-7, welche ein bereits gut untersuchtes Modellsystem von hormonabhängigem Brustkrebs auch im Hinblick

auf den Einfluß von Wachstumsfaktoren darstellen (Dickson et Lippman, 1995). Wir verglichen die Expression dieser 80 Gene nach Inkubation der Zellen mit 50 ng BMP-2 mit den serumfreien Kontrollen nach 0-, 5- und 24-stündiger Inkubation. Aufgrund der bisher in der Literatur beschriebenen dosis- und zeitabhängigen Wirkung von BMP-2, wählten wir diese Konzentration und diese zwei Inkubationszeiten (Cunningham et al., 1992; Varghese et Canalis, 1997; Clement et al., 2000; Palosaari et al., 2003; Waite und Eng, 2003). Der zusätzliche 0-Stunden-Wert wurde sozusagen als Negativkontrolle mitgeführt. Zu einer veränderten Expression kann es nämlich schon kommen, weil der Mediumwechsel eine mechanische Belastung für die Zellen darstellt. Außerdem ändert sich das umgebende Milieu. Autokrine Faktoren der inkubierten Zellen werden beim Mediumwechsel entfernt und der Gradient bzw. die Konzentration dieser Faktoren muß sich erst wieder aufbauen.

Die rechnerische Auswertung erfolgte mit dem Computerprogramm AIDA, Raytest GmbH. Die Rohdaten wurden hinsichtlich der Hintergrundintensitäten korrigiert und die Mittelwerte von zwei korrespondierenden Signalen berechnet. Um die Vergleichbarkeit unabhängiger Experimente herzustellen, wurden die Werte auf die Referenzgene, die sogenannten „housekeeping genes“ β -Aktin, GAPDH, R13a und rS9, normalisiert.

Leider konnten aufgrund von Verschmutzungen einiger Filter nicht alle Gene in beiden Versuchsreihen beurteilt werden, da eine genaue Messung der Expressionsstärke aufgrund der Verfärbungen des Hintergrundes nicht möglich war.

Voraussetzung für eine regulative Veränderung der einzelnen Gene waren vergleichbare Ergebnisse aus den Doppelbestimmungen der korrespondierenden Punkte (jeweils zwei pro Versuch) sowie Änderungen der Genexpression in die gleiche Richtung bei den zwei Versuchen. Außerdem wurde eine Intensitätsänderung nach Bildung des logarithmierten Quotienten aus BMP-2 inkubierten und serumfreien Werten von $> 0,5$, d.h. eine Änderung um das etwa 1,5-fache, und eine Änderung des Ranges um > 2 vorausgesetzt.

Diese stringenten Kriterien sind aufgrund der inherenten Variabilität der cDNA-Hybridisierungssignale notwendig. Besonders wenn Gene zu sehr geringen Levels exprimiert werden, führt die signal-to-noise-ratio zu einer scheinbaren Erhöhung der

Expression aufgrund der Einschränkungen der Evaluation der Signale. Außerdem scheint es möglich, dass sehr hohe Signalintensitäten unterschätzt werden. So könnten auch Unterschiede, welche unsere Einschlusskriterien nicht erfüllen, signifikante Änderungen der Genexpression bedeuten. Des Weiteren bleibt natürlich das Problem, dass in manchen Fällen auch nur minimale Änderungen der mRNA Level biologisch relevant sein können.

Die Analyse der so gewonnenen Daten lässt dabei vermuten, dass die meisten Gene mit und ohne Inkubation mit BMP-2 zu gleichen Levels exprimiert werden. Einige der Proteasen fanden wir dennoch reproduzierbar verändert.

Die dabei gefundenen Ergebnisse wurden durch eine zweite, unabhängige Methode überprüft. Die PCR stellt ein geeignetes Verfahren dar, um den RNA-Gehalt unter gleichen Bedingungen wie bei dem Arrayverfahren zu bestimmen. Eine Verunreinigung der in der PCR eingesetzten cDNA mit genomischer DNA konnte dabei nie völlig ausgeschlossen werden. Die für die Genamplifikation benutzten Primer wurden daher so ausgewählt, daß sie stets in unterschiedlichen Exons plaziert waren. So wären die von der genomischen DNA entstehenden Amplifikationsprodukte weitaus größer ausgefallen und man hätte sie leicht von den aus cDNA generierten PCR-Produkten unterscheiden können. Zur weiteren Auswertung wurden die Proben densitometrisch vermessen und anhand der jeweiligen Menge β -Aktin standardisiert. Wie gesagt, es können auch geringe Änderungen des mRNA-Gehalts biologisch relevant sein. Deswegen ist es durchaus möglich, dass bei zu hohen Signalintensitäten Veränderungen in der Genexpression sogar noch unterschätzt werden. Um diesem Fehler entgegen zu wirken, der vor allem auftritt, wenn die Taq-Polymerase nicht mehr im linearen Bereich arbeitet, wurden die densitometrisch bestimmten Flächeninhalte der PCR-Banden anhand einer mit Aktin-Standards hergestellten Eichkurve korrigiert. Durch die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, auch unter Berücksichtigung der mit dem Microarray gewonnenen Ergebnisse der Veränderungen der mRNA-Expression, lassen sich richtungsweisende Trends beschreiben. Eine weitere Verfolgung der gewonnenen Hinweise mit anderen Methoden, z.B. Western-Blots oder Enzymaktivitätsmessungen, ist zur biologischen und klinischen Einordnung dieser Befunde unerlässlich.

Im folgenden werden die von uns mittels cDNA-Microarray und PCR erhobenen Daten der veränderten RNA-Expression der Proteasen einzeln diskutiert.

Schon in den frühen achtziger Jahren wurden Proteasen mit dem Prozeß der Metastasierung in Verbindung gebracht und im einzelnen auf ihre Wirkung und ihren Nutzen im Hinblick auf Prognose und Therapie maligner Tumoren untersucht. Cathepsin B, welches ursprünglich als lysosomale Cystein-Protease entdeckt wurde, aber gleichfalls auch eine wichtige Matrixprotease ist, wurde schon 1982 als potentieller Marker für metastatisches Potential in Melanomzellen beschrieben (Sloane et al., 1982). Erhöhte Expressionslevel und Aktivität von Cathepsin B sind mittlerweile bei vielen Tumoren und Tumorzelllinien, z.B. Kolorektalkarzinome, Magenkarzinome, Hepatozelluläre- und Cholangiokarzinome, Melanome und Mammakarzinome, beschrieben worden (Watanabe et al., 1987; Watanabe et al., 1989; Qian et al., 1989; Murnane et al., 1991; Lah et al., 1992b; Scaddan und Dufresne, 1993; Campo et al., 1994; Sukoh et al., 1994; Terada et al., 1995; Herszenyi et al., 1999; Russo et al., 2000; Olszewska et al., 2001).

Bei Brustkrebszellen ist auch eine prognostische Signifikanz für Cathepsin B im Sinne eines Indikators der Tumorprogression beschrieben. Dabei fanden Foekens et al. eine positive Korrelation zum Lymphknotenstatus und zur Rezidiv- und Sterberate sowie eine negative Korrelation zum Rezeptorstatus. Keine Korrelation wurde gefunden für die Parameter Alter der Patienten, Menopause und Tumorgröße (Foekens et al., 1998). Andere Arbeitsgruppen fanden keine bzw. negative (Gabrijelcic et al., 1992a) Korrelationen bezüglich des Lymphknoten- und des Rezeptorstatus, aber ebenfalls eine signifikante Erhöhung der Rezidivrate sowie eine Verkürzung der Überlebenszeit bei erhöhten Expressionsleveln von Cathepsin B (Thomssen et al., 1995; Maguire et al., 1998; Lah et al., 2000a+b). Bervar et al. fanden, dass die Cathepsin B Expression in Mammakarzinomzelllinien der *in-vitro* Invasivität dieser Zellen entspricht (Bervar et al., 2003).

Der Einfluß von BMP-2 auf die Cathepsin B Expression in Mammakarzinomzellen wurde bisher noch nicht untersucht. Wir fanden eine erniedrigte Expression von Cathepsin B nach 5-stündiger Inkubation mit BMP-2. Diese konnte allerdings mit der PCR-Methode nicht reproduzierbar bestimmt werden. Die 24-stündige Inkubation mit

BMP-2 zeigte weder im Proteasenchip noch in der PCR Änderungen der Genexpression.

Die in den Boyden-Chamber und Transwellversuchen gefundenen Erhöhungen der Invasivität bzw. der Migration der Mammakarzinomzellen nach Inkubation mit BMP-2 würden vor dem Hintergrund der oben erwähnten Literatur eher eine Erhöhung der Proteasen vermuten lassen.

Ausgehend von der Hypothese, dass Tumorinvasion durch ein Ungleichgewicht zwischen den Proteasen und ihren Inhibitoren zustande kommt, müssen natürlich auch die Gegenspieler untersucht werden. In normalem Gewebe wird die Funktion von Cathepsin B streng durch die Cystein-Proteasen-Inhibitoren Stefin A und Cystatin C kontrolliert (Kane und Gottesman, 1990; Sloane, 1990; Sloane et al., 1990a+b). Besonders Cystatin C ist bekannt als der stärkste Inhibitor von Cathepsin B mit einer sehr niedrigen Inhibitionskonstante von 0,25 (Barrett et al., 1984). Yano et al. konnten zeigen, dass Cystatin C relativ zu Cathepsin B in humanen Brustkrebszellen erniedrigt war. Ein Vergleich der Genexpressionen zum Normalgewebe erbrachte keine signifikanten Ergebnisse. Auch wurden keine Korrelationen zwischen Cathepsin B und Cystatin C Expressionen in bezug auf Histologie, Lymphknotenstatus, Tumorgroße und Hormonstatus gefunden (Yano et al., 2001).

Wir fanden Cystatin C nach 5- und 24-stündiger Inkubation mit BMP-2 weder im cDNA-Microarray noch in der PCR reproduzierbar verändert. Im Vergleich zu Cathepsin B also nach 5-stündiger BMP-2-Inkubation eher erhöht.

Die Expression von Proteinaseinhibitoren, Cystatin A, B und C, in Brustkrebszellen sowie im benachbarten Bindegewebe wurde schon 1989 von Kolar et al. beschrieben (Kolar et al., 1989). Lah et al. fanden eine Verminderung der totalen inhibitorischen Aktivität von Cysteinproteinaseinhibitoren in Tumorgewebe im Vergleich zu Normalgewebe (Lah et al., 1992a). Klinische Untersuchungen von Cathepsinen und ihren endogenen Inhibitoren konnten in den folgenden Jahren eine prognostische Relevanz der Expression dieser Moleküle in verschiedenen Tumoren in bezug auf die Überlebenszeit der Patienten zeigen (Kos et Lah, 1998). Eine direkte Korrelation zwischen der Expression von Cystatin A und der Tumorgroße, der mitotischen Aktivität

und dem tumorbedingtem Tod wurde von Kuopio et al. beschrieben (Kuopio et al., 1998).

Wir fanden auch die Expression von Cystatin A nach 5- und 24-stündiger Inkubation mit BMP-2 weder im cDNA-Microarray noch in der PCR reproduzierbar verändert. Allerdings ist wahrscheinlich eher das schon angesprochene Ungleichgewicht der Proteasen und ihrer korrespondierenden Inhibitoren von Bedeutung als die messbare Richtung der Regulation. Außerdem spiegeln wie gesagt die Expressionslevel auf mRNA-Ebene nicht notwendigerweise die letztendliche Aktivität der produzierten Proteine wieder.

Eine Schlüsselrolle in der proteolytischen Kaskade, welche zu Invasion und Metastasierung führt, spielt auch Cathepsin D. Die Aspartylprotease wurde 1989 von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen durch erhöhte Konzentrationen im Tumorgewebe mit einer kürzeren Überlebenszeit von Brustkrebspatienten assoziiert (Spiratos et al., 1989; Thorpe et al., 1989). Seitdem sind erhöhte Expressionslevel von Cathepsin D in Tumoren immer wieder in der Literatur beschrieben und mit verschiedenen prognostischen Merkmalen korreliert worden. Übereinstimmend fanden sich eine reduzierte tumorfreie Zeit und eine verkürzte Überlebenszeit (Tandon et al., 1990; Ferrandina et al., 1997; Kute et al., 1998; Foekens et al., 1999; Leto et al., 2004;). Zum Teil widersprüchliche Aussagen fanden sich über Korrelationen zum Tumorstadium, histologischer Differenzierung, Lymphknotenstatus, Rezeptorstatus oder Alter der Patienten (Barbi et al., 1994; Castiglioni et al., 1994; Lah et al., 2000a+b; Zheng et al., 2002; Ioachim et al., 2003). Der genaue Wirkungsmechanismus, durch den die Tumorprogression erreicht wird, ist noch unklar. Beschrieben sind allerdings eine durch erhöhte Expressionslevel verstärkte Invasivität und Angiogenese sowie Tumorwachstum und Metastasierung (Rocheffort et al., 1992a+b; Rocheffort et al., 1998; Olzewska et al., 2001; Premzl et al., 2001; Berchem et al., 2002; Glondou et al., 2002). Gegensätzliche Ergebnisse lieferten Untersuchungen von Johnson et al., welche keine Korrelationen zwischen Cathepsin D Sekretion und Boyden Chamber Invasivität finden konnten. Die Expressionslevel zeigten *in vivo* und *in vitro* eher eine inverse Korrelation zu aggressivem Tumorverhalten (Johnson et al., 1993).

Unsere Ergebnisse zeigten eine sowohl im cDNA-Microarray als auch in der PCR reproduzierbare Runterregulierung der Cathepsin D Expression durch 5-stündige Inkubation mit BMP-2. Nach 24 Stunden zeigten sich keine reproduzierbaren Veränderungen. Wie oben erwähnt, können diese Methoden nur Veränderungen auf der mRNA-Ebene aufzeigen. Eine Aussage über die Aktivität der Protease kann dabei nicht getroffen werden.

Die Aktivität hängt dabei nicht nur von der Expression des entsprechenden Gens ab. Dieses codiert nämlich zunächst für den Precursor, pro-Cathepsin D, welches keine proteolytische Aktivität hat. Allerdings wird es durch eine saure Umgebung aktiviert. Dabei ist das extrazelluläre Milieu in soliden Tumoren generell saurer als in Normalgewebe (Griffiths, 1991) bzw. haben Brustkrebszelllinien *in vitro* ein hohes Potential, das extrazelluläre Milieu anzusäuern (Montcourrier et al., 1997). Auch eine endosomale Maturation *in vivo* in benachbarten Tumorzellen oder Bindegewebe wird diskutiert (Laurent-Matha et al., 1998). Erhöhte Expressionslevel des Precursors sind mit einer schlechten Prognose bei Mammakarzinompatienten korreliert worden (Thorpe et al., 1989).

Der Einfluß von Wachstumsfaktoren auf die Expression dieses Gens wurde bisher noch nicht untersucht. Die von uns gefundenen Ergebnisse einer verminderten Expression nach Inkubation mit dem proinvasiven Faktor BMP-2 müssen aber auch hier im Zusammenhang mit einer eventuellen Dysbalance zwischen Proteasen und Inhibitor sowie einer eventuell von der Expressionsstärke auf mRNA-Ebene abweichenden Aktivität gesehen werden.

Von allen Cathepsinen ist Cathepsin K in Osteoklasten am stärksten exprimiert. Da es extrazelluläre Matrix einschließlich Knochenmatrixproteinen abbauen kann, ist es möglich, dass Cathepsin K zum invasiven Potential von Brustkrebszellen beiträgt, insbesondere hinsichtlich der Knochenmetastasierung. Die Expression von Cathepsin K in invasiven Brustkrebszellen, allerdings in einer niedrigeren Intensität als in Osteoklasten, wurde erstmals von Littlewood-Evans et al. beschrieben (Littlewood-Evans et al., 1997). Ishibashi et al. fanden mittels kompetitiver RT-PCR keine

Expression von Cathepsin K in den Brustkrebszelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 (Ishibashi et al., 1999).

Wir konnten die Expression von Cathepsin K in der Brustkrebszelllinie MCF-7 sowohl mittels cDNA-Microarray als auch mit PCR nachweisen. Nach 5-stündiger Inkubation mit BMP-2 fanden wir dabei eine reproduzierbar verminderte Expression. Nach Inkubation für 24 Stunden konnte dies nicht mehr gezeigt werden.

Kaneko et al. konnten im Rahmen von Untersuchungen der Knochenresorption unter Einfluß verschiedener BMPs eine signifikante Erhöhung der mRNA Expression von Cathepsin K durch BMP-2 in Osteoklasten zeigen (Kaneko et al., 2000). Da BMPs unterschiedliche Wirkungen auf verschiedene Zelltypen haben, ist eine differentielle Regulierung der Genexpression nicht nur möglich, sondern auch wahrscheinlich. Dennoch kann hier keine Aussage über die tatsächliche Aktivität der Protease gemacht werden.

Auch die lysosomale Cysteinprotease Cathepsin H fanden wir in MCF-7-Zellen exprimiert. Dies wurde bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben (Scaddan et Dufresne, 1993; Ishibashi et al., 1999). Gabrijelcic et al. fanden eine deutliche Erhöhung von Cathepsin H in Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe von Brustkrebspatienten (Gabrijelcic et al., 1992a). Dabei waren die Expressionslevel von Cathepsin H im Vergleich zu anderen Cathepsinen am höchsten (Gabrijelcic et al., 1992b).

Unter Einfluß von BMP-2 konnten wir sowohl im cDNA-Microarray als auch in der PCR eine reproduzierbare Herunterregulierung der Genexpression von Cathepsin H zeigen. Dies gilt wiederum nur für die 5-Stunden Werte. Nach 24-stündiger Inkubation waren keine Veränderungen mehr messbar. Über die biologische Wertigkeit dieser Ergebnisse kann hier keine Aussage getroffen werden, da wir mit Zelllinien arbeiten und daher ein Vergleich zwischen Tumor und Normalgewebe nicht möglich ist.

Ein weiterer Schritt in der Tumorprogression ist die Verhinderung von Apoptose in Tumorzellen. Dabei sind Caspasen als proapoptotische Moleküle bekannt. Untersuchungen der Expressionlevel von Caspase 3 und 7 in Brustkrebszellen zeigten keine Korrelation mit dem Ausmaß an Apoptose oder klinisch-morphologischen

Zeichen der Tumoren (Grigoriev et al., 2002). Zhang et al. fanden kürzlich die Expression von Survivin in Brustkrebszellen erhöht. Dies ist ein neu identifizierter Apoptoseinhibitor, welcher den programmierten Zelltod durch Inhibition der Funktion von Caspase 3 und 7 blocken kann. Überexpression dieses Moleküls trägt zur Tumorgenese und –progression von Brustkrebs bei und indiziert eine schlechtere Prognose (Zhang et al., 2004).

Im cDNA-Microarray konnten wir eine Runterregulierung von Caspase 7 nach 5-stündiger Inkubation mit BMP-2 zeigen. Diese Ergebnisse konnten mit der PCR nicht bestätigt werden. Nach 24-stündiger Inkubation konnten weder im Proteasenchip noch in der PCR messbare Veränderungen festgestellt werden. Dennoch sprechen diese Ergebnisse, besonders vor dem Hintergrund der oben beschriebenen Literatur, zumindest für eine generelle Dysfunktion der spontanen Apoptose durch veränderte Expression der beteiligten Mediatoren.

Die Gruppe der Integrine ist eine Familie von transmembranen Adhäsionsrezeptoren, welche aus nicht kovalent gebundenen α - und β - Untereinheiten bestehen. Generell kontrolliert die Integrinaktivierung die Zelladhäsion (Schwartz, 1995). Einzelne Moleküle sind dabei an einer Vielzahl von Schritten im Rahmen der Tumorprogression, wie zum Beispiel Zellwachstum, Differenzierung, Apoptose, Migration, Invasion, Angiogenese und damit Metastasierung, beteiligt (Brooks et al., 1994a+b; Fujita et al., 1995; Pignatelli und Stamp, 1995; Liapis et al., 1996; Gasparini et al., 1998; Ruoslahti, 1999; Byzova et al., 2000b; Morini et al., 2000; Felding-Habermann et al., 2001; Schwartz und Ginsberg, 2002; Arboleda et al., 2003; Berry et al., 2003; Rolli et al., 2003; Chen et al., 2004; Karadag et al., 2004). Veränderte Expressionsmuster verschiedener Integrine und ihrer Adhäsionsmoleküle in invasiven Brusttumoren wurden bereits 1992 von Pignatelli et al. beschrieben (Pignatelli et al., 1992).

Wir fanden in der Brustkrebszelllinie MCF-7 nach Inkubation mit BMP-2 Veränderungen der Genexpression der Integrine β 4 und β 5.

Integrin β 4 ist ein Rezeptor für einige Mitglieder der Laminin-Familie und ist bevorzugt an der basalen Oberfläche der meisten Epithelien exprimiert, wo es zu den verschiedensten Basalmembraninteraktionen beiträgt. Verminderte Expression von

Integrin β 4 in Tumorzellen im Vergleich zum normalen Brustgewebe und eine verminderte Migration von Brustkrebszellen durch Inhibition von Integrin β 4 sind beschrieben (Shimizu et al., 2002; Lipscomb et al., 2003). *In-vitro* Assays mit transfizierter cDNA konnten eine Beteiligung von Integrin β 4 an der Invasivität von Tumorzellen zeigen (Rabinovitz et Mercurio, 1996). Tagliabue et al. beschrieben eine Assoziation der Integrin β 4 und korrespondierenden Laminin Expression mit einer schlechten Prognose von Brustkrebspatienten (Tagliabue et al., 1998). Eine Korrelation zwischen Integrin β 4 Expression und Überlebenszeit von Brustkrebspatienten im Sinne eines prognostischen Indikators konnte nicht bestätigt werden (Berry et al., 2004).

Jones et al. untersuchten 1997 erstmals die Wirkung von einem Wachstumsfaktor, TGF- β , auf Integrin β 4 und fanden einen anti-invasiven Effekt auf Brustkrebszelllinien durch erhöhte Genexpression von Integrin β 4 (Jones et al., 1997).

Wir fanden nach 5- und 24-stündiger Inkubation mit BMP-2 die Genexpression von Integrin β 4 in der Zelllinie MCF-7 ebenfalls erhöht. Dies ließ sich im c-DNA-Microarray und für die 5-Stunden-Werte auch in der PCR reproduzierbar nachweisen. Ob und inwiefern diese Erhöhung der mRNA-Expression von Integrin β 4 eine anti-invasive Wirkung hat, kann dabei nicht beurteilt werden. Allerdings ist die Resistenz von Brustkrebszellen gegen Apoptose abhängig von Integrin β 4 (Weaver et al., 2002) und auch die Adhäsion von extrazellulärer Matrix in einigen Fällen eher der Tumorprogression als der Tumordinhibition zuträglich (Tani et al., 1997; Pfohler et al., 1998).

Eine Aktivierung von Integrin β 5 durch den Wachstumsfaktor VEGF wurde von Byzova et al. beschrieben (Byzova et al., 2000a). Wir fanden eine Herunterregulierung der Genexpression von Integrin β 5 nach 24-stündiger Inkubation mit BMP-2. Dies konnte in der PCR nicht bestätigt werden.

Es kann keine abschließende Aussage über die Regulation von Integrinen unter Einfluß von BMP-2 getroffen werden. Aber die Ergebnisse weisen auf eine Veränderung des Expressionsmusters von Integrin β 4 und β 5 hin, welche eine Rolle in der Tumorbilogie spielen kann.

Generell ließen sich vor allem Veränderungen der m-RNA-Expression der untersuchten Proteasen nach 5-stündiger Inkubation mit BMP-2 finden. Bis auf Integrin β 5 im Proteasenchip ließen sich weder im Microarray noch in der PCR reproduzierbare Veränderungen nach 24-stündiger Inkubation mit BMP-2 finden. Aufgrund der biologischen Halbwertszeit von rekombinantem BMP-2 von 75 Minuten und vor dem Hintergrund der allein durch serumfreie Inkubation beschriebenen Veränderungen der Genexpression ist diese verminderte bzw. aufgehobene Wirkung von BMP-2 nach 24 Stunden verständlich.

Andere untersuchte Proteasen fanden wir im c-DNA-Microarray nicht verändert in ihrer Expression.

Unter Einfluß von BMP-2 wurden bereits Veränderungen der Expression und Aktivität verschiedener MMPs (MMP 1 und MMP 9) und TIMPs (TIMP 1 und TIMP 3) in Osteoblasten (Varghese et Canalis, 1997), Präodontoblasten (Takiguchi et al., 1998) und Odontoblasten (Gazzerro et al., 1999; Palosaari et al., 2003) beschrieben. Dies konnten wir für die übereinstimmend untersuchten Proteasen MMP 1, MMP 9, TIMP 1 und TIMP 3, in der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 nicht zeigen.

Die Expression von Collagenase 3 (MMP 13) wurde mit dem verwendeten Proteasenchip leider nicht untersucht. Allerdings konnte unsere Arbeitsgruppe bereits in früheren Untersuchungen eine verminderte Expression dieser Protease unter Einfluß von BMP-2 in der Brustkrebszelllinie MCF-7 zeigen. Dies bestärkt die in der Literatur beschriebene Herunterregulation von Collagenase 3 unter Einfluß von BMP-2 in verschiedenen Zellen (Varghese et Canalis, 1997; Gazzerro et al., 1999; Palosaari et al., 2002).

6. SCHLUSSFOLGERUNGEN

Schlußfolgernd lässt sich sagen, dass BMP-2 *in vitro* die Invasivität und Migration von Brustkrebszellen steigert. Über die Beteiligung von Proteasen an diesen Prozessen können aufgrund der geringen Anzahl an Experimenten und der limitierten Anzahl an untersuchten Genen keine abschließenden Aussagen getroffen werden. Allerdings ist eine Dysregulation der untersuchten Proteasen unter Einfluß von BMP-2 auch vor dem Hintergrund der oben beschriebenen Literatur mehr als wahrscheinlich. In Bezug auf die klinische Relevanz dieser Ergebnisse hinsichtlich der Tumorprogression und Metastasierung von Brustkrebs müssen natürlich noch weitere Untersuchungen über Wirkungsweise und Funktion von BMP-2 und den regulierten Proteasen durchgeführt werden, um diese eventuell diagnostisch oder therapeutisch im klinischen Alltag einzusetzen.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Aberg T, Wozney J, Thesleff I. 1997. Expression Patterns of Bone Morphogenetic Proteins (Bmps) in the Developing Mouse Tooth Suggest Roles in Morphogenesis and Cell Differentiation. *Dev Dyn* 210(4):383-96.
- Ahrens M, Ankenbauer T, Schroder D, Hollnagel A, Mayer H, Gross G. 1993. Expression of Human Bone Morphogenetic Proteins-2 or -4 in Murine Mesenchymal Progenitor C3H10T1/2 Cells Induces Differentiation into Distinct Mesenchymal Cell Lineages. *DNA Cell Biol* 12(10):871-80.
- Albini A, Iwamoto Y, Kleinman HK, Martin GR, Aaronson SA, Kozlowski J, McEwan RN. 1987. A Rapid in Vitro Assay for Quantitating the Invasive Potential of Tumor Cells. *Cancer Res* 47(12):3239-45.
- Arboleda MJ, Lyons JF, Kabbinavar FF, Bray MR, Snow BE, Ayala R, Danino M, Karlan BY, Slamon DJ. 2003. Overexpression of AKT2/Protein Kinase Bbeta Leads to Up-Regulation of Beta1 Integrins, Increased Invasion, and Metastasis of Human Breast and Ovarian Cancer Cells. *Cancer Res* 63(1):196-206.
- Arihiro K, Inai K. 2001. Expression of CD31, Met/Hepatocyte Growth Factor Receptor and Bone Morphogenetic Protein in Bone Metastasis of Osteosarcoma. *Pathol Int* 51(2):100-6.
- Azari K, Doll BA, Sfeir C, Mu Y, Hollinger JO. 2001. Therapeutic Potential of Bone Morphogenetic Proteins. *Expert Opin Investig Drugs* 10(9):1677-86.
- Aznavorian S, Liotta LA, Kupchik HZ. 1990. Characteristics of Invasive and Noninvasive Human Colorectal Adenocarcinoma Cells. *J Natl Cancer Inst* 82(18):1485-92.
- Barbi GP, Margallo E, Margiocco M, Paganuzzi M, Marroni P, Costanzi B, Gatteschi B, Tanara G, Spina B, Nicolo G. 1994. Evaluation of Cathepsin D As Prognostic Predictor in Breast Cancer. *Oncology* 51(4):329-33.
- Barnes J, Anthony CT, Wall N, Steiner MS. 1995. Bone Morphogenetic Protein-6 Expression in Normal and Malignant Prostate. *World J Urol* 13(6):337-43.
- Barrett AJ, Davies ME, Grubb A. 1984. The Place of Human Gamma-Trace (Cystatin C) Amongst the Cysteine Proteinase Inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* 120(2):631-6.

- Bellusci S, Henderson R, Winnier G, Oikawa T, Hogan BL. 1996. Evidence From Normal Expression and Targeted Misexpression That Bone Morphogenetic Protein (Bmp-4) Plays a Role in Mouse Embryonic Lung Morphogenesis. *Development* 122(6):1693-702.
- Benitez-Bribiesca L, Martinez G, Ruiz MT, Gutierrez-Delgado F, Utrera D. 1995. Proteinase Activity in Invasive Cancer of the Breast. Correlation With Tumor Progression. *Arch Med Res* 26 Spec No:S163-S168.
- Berchem G, Glondou M, Gleizes M, Brouillet JP, Vignon F, Garcia M, Liaudet-Coopman E. 2002. Cathepsin-D Affects Multiple Tumor Progression Steps in Vivo: Proliferation, Angiogenesis and Apoptosis. *Oncogene* 21(38):5951-5.
- Berry MG, Goode AW, Puddefoot JR, Vinson GP, Carpenter R. 2003. Integrin Beta1-Mediated Invasion of Human Breast Cancer Cells: an Ex Vivo Assay for Invasiveness. *Breast Cancer* 10(3):214-9.
- Berry MG, Gui GP, Wells CA, Carpenter R. 2004. Integrin Expression and Survival in Human Breast Cancer. *Eur J Surg Oncol* 30(5):484-9.
- Bervar A, Zajc I, Sever N, Katunuma N, Sloane BF, Lah TT. 2003. Invasiveness of Transformed Human Breast Epithelial Cell Lines Is Related to Cathepsin B and Inhibited by Cysteine Proteinase Inhibitors. *Biol Chem* 384(3):447-55.
- Bhatia S, Robison LL, Oberlin O, Greenberg M, Bunin G, Fossati-Bellani F, Meadows AT. 1996. Breast Cancer and Other Second Neoplasms After Childhood Hodgkin's Disease. *N Engl J Med* 334(12):745-51.
- Bishop JM. 1985. Exploring Carcinogenesis with Retroviral and Cellular Oncogenes. *Prog Med Virol* 32:5-14.
- Bishop JM. 1991. Molecular Themes in Oncogenesis. *Cell* 64(2):235-48.
- Boice JD Jr, Mandel JS, Doody MM. 1995. Breast Cancer Among Radiologic Technologists. *JAMA* 274(5):394-401.
- Branford WW, Essner JJ, Yost HJ. 2000. Regulation of Gut and Heart Left-Right Asymmetry by Context-Dependent Interactions Between *Xenopus* Lefty and BMP4 Signaling. *Dev Biol* 223(2):291-306.
- Breast Cancer and Hormone Replacement Therapy: Collaborative Reanalysis of Data From 51 Epidemiological Studies of 52,705 Women With Breast Cancer and 108,411 Women Without Breast Cancer. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. 1997. *Lancet* 350(9084):1047-59.
- Brooks PC, Montgomery AM, Rosenfeld M, Reisfeld RA, Hu T, Klier G, Cheresch DA. 1994. Integrin Alpha v Beta 3 Antagonists Promote Tumor Regression by Inducing Apoptosis of Angiogenic Blood Vessels. *Cell* 79(7):1157-64.

- Brooks PC, Clark RA, Cheresch DA. 1994. Requirement of Vascular Integrin Alpha v Beta 3 for Angiogenesis. *Science* 264(5158):569-71.
- Byzova TV, Goldman CK, Pampori N, Thomas KA, Bett A, Shattil SJ, Plow EF. 2000. A Mechanism for Modulation of Cellular Responses to VEGF: Activation of the Integrins. *Mol Cell* 6(4):851-60.
- Byzova TV, Kim W, Midura RJ, Plow EF. 2000. Activation of Integrin Alpha(V)Beta(3) Regulates Cell Adhesion and Migration to Bone Sialoprotein. *Exp Cell Res* 254(2):299-308.
- Campo E, Munoz J, Miquel R, Palacin A, Cardesa A, Sloane BF, Emmert-Buck MR. 1994. Cathepsin B Expression in Colorectal Carcinomas Correlates With Tumor Progression and Shortened Patient Survival. *Am J Pathol* 145(2):301-9.
- Castiglioni T, Merino MJ, Elsner B, Lah TT, Sloane BF, Emmert-Buck MR. 1994. Immunohistochemical Analysis of Cathepsins D, B, and L in Human Breast Cancer. *Hum Pathol* 25(9):857-62.
- Chaloux E, Lopez-Rovira T, Rosa JL, Bartrons R, Ventura F. 1998. JunB Is Involved in the Inhibition of Myogenic Differentiation by Bone Morphogenetic Protein-2. *J Biol Chem* 273(1):537-43.
- Chen C, Young BA, Coleman CS, Pegg AE, Sheppard D. 2004. Spermidine/Spermine N1-Acetyltransferase Specifically Binds to the Integrin Alpha9 Subunit Cytoplasmic Domain and Enhances Cell Migration. *J Cell Biol* 167(1):161-70.
- Cheung VG, Morley M, Aguilar F, Massimi A, Kucherlapati R, Childs G. 1999. Making and Reading Microarrays. *Nat Genet* 21(1 Suppl):15-9.
- Clement JH, Sanger J, Hoffken K. 1999. Expression of Bone Morphogenetic Protein 6 in Normal Mammary Tissue and Breast Cancer Cell Lines and Its Regulation by Epidermal Growth Factor. *Int J Cancer* 80(2):250-6.
- Clement JH, Marr N, Meissner A, Schwalbe M, Sebald W, Kliche KO, Hoffken K, Wolf S. 2000. Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2) Induces Sequential Changes of Id Gene Expression in the Breast Cancer Cell Line MCF-7. *J Cancer Res Clin Oncol* 126(5):271-9.
- Colditz GA, Willett WC, Hunter DJ, Stampfer MJ, Manson JE, Hennekens CH, Rosner BA. 1993. Family History, Age, and Risk of Breast Cancer. Prospective Data From the Nurses' Health Study. *JAMA* 270(3):338-43.
- Cook SD, Rueger DC. 1996. Osteogenic Protein-1: Biology and Applications. *Clin Orthop* (324):29-38.

- Cooper GM. 2000. The Development and Causes of Cancer. Cooper, G. M. The Cell - A molecular approach. 2 ed. Sunderland, MS: Sinauer Associates, Inc.
- Cunningham NS, Paralkar V, Reddi AH. 1992. Osteogenin and Recombinant Bone Morphogenetic Protein 2B Are Chemotactic for Human Monocytes and Stimulate Transforming Growth Factor Beta 1 mRNA Expression. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 89(24):11740-4.
- Daopin S, Piez KA, Ogawa Y, Davies DR. 1992. Crystal Structure of Transforming Growth Factor-Beta 2: an Unusual Fold for the Superfamily. *Science* 257(5068):369-73.
- Davidson NE. 1995. Hormone-Replacement Therapy--Breast Versus Heart Versus Bone. *N Engl J Med* 332(24):1638-9.
- DeRisi J, Penland L, Brown PO, Bittner ML, Meltzer PS, Ray M, Chen Y, Su YA, Trent JM. 1996. Use of a CDNA Microarray to Analyse Gene Expression Patterns in Human Cancer. *Nat Genet* 14(4):457-60.
- Derynck R, Lindquist PB, Lee A, Wen D, Tamm J, Graycar JL, Rhee L, Mason AJ, Miller DA, Coffey RJ. 1988. A New Type of Transforming Growth Factor-Beta, TGF-Beta 3. *EMBO J* 7(12):3737-43.
- Dickson RB, Lippman ME. 1988. Control of Human Breast Cancer by Estrogen, Growth Factors, and Oncogenes. *Cancer Treat Res* 40:119-65.
- Dickson RB, Lippman ME. 1995. Growth Factors in Breast Cancer. *Endocr Rev* 16(5):559-89.
- Dorai H, Vukicevic S, Sampath TK. 2000. Bone Morphogenetic Protein-7 (Osteogenic Protein-1) Inhibits Smooth Muscle Cell Proliferation and Stimulates the Expression of Markers That Are Characteristic of SMC Phenotype in Vitro. *J Cell Physiol* 184(1):37-45.
- Ducy P, Karsenty G. 2000. The Family of Bone Morphogenetic Proteins. *Kidney Int* 57(6):2207-14.
- Duffy MJ. 1992. The Role of Proteolytic Enzymes in Cancer Invasion and Metastasis. *Clin Exp Metastasis* 10(3):145-55.
- Edwards DR, Murphy G. 1998. Cancer. Proteases-Invasion and More. *Nature* 394(6693):527-8.
- Familial Breast Cancer: Collaborative Reanalysis of Individual Data From 52 Epidemiological Studies Including 58,209 Women With Breast Cancer and 101,986 Women Without the Disease. 2001. *Lancet* 358(9291):1389-99.

- Felding-Habermann B, O'Toole TE, Smith JW, Fransvea E, Ruggeri ZM, Ginsberg MH, Hughes PE, Pampori N, Shattil SJ, Saven A, Mueller BM. 2001. Integrin Activation Controls Metastasis in Human Breast Cancer. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 98(4):1853-8.
- Ferrandina G, Scambia G, Bardelli F, Benedetti-Panici P, Mancuso S, Messori, A. 1997. Relationship Between Cathepsin-D Content and Disease-Free Survival in Node-Negative Breast Cancer Patients: a Meta-Analysis. *Br J Cancer* 76(5):661-6.
- Foekens JA, Kos J, Peters HA, Krasovec M, Look MP, Cimerman N, Meijer-van Gelder ME, Henzen-Logmans SC, van Putten WL, Klijn JG. 1998. Prognostic Significance of Cathepsins B and L in Primary Human Breast Cancer. *J Clin Oncol* 16(3):1013-21.
- Foekens JA, Look MP, Bolt-de Vries J, Meijer-van Gelder ME, van Putten WL, Klijn JG. 1999. Cathepsin-D in Primary Breast Cancer: Prognostic Evaluation Involving 2810 Patients. *Br J Cancer* 79(2):300-7.
- Friedlaender GE, Perry CR, Cole JD, Cook SD, Cierny G, Muschler GF, Zych GA, Calhoun JH, LaForte AJ, Yin S. 2001. Osteogenic Protein-1 (Bone Morphogenetic Protein-7) in the Treatment of Tibial Nonunions. *J Bone Joint Surg Am* 83-A Suppl 1(Pt 2):151-158.
- Fujita S, Watanabe M, Kubota T, Teramoto T, Kitajima M. 1995. Alteration of Expression in Integrin Beta 1-Subunit Correlates With Invasion and Metastasis in Colorectal Cancer. *Cancer Lett* 91(1):145-9.
- Gabrijelcic D, Svetic B, Spaic D, Skrk J, Budihna M, Dolenc I, Popovic T, Cotic V, Turk V. 1992. Cathepsins B, H and L in Human Breast Carcinoma. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 30(2):69-74.
- Gabrijelcic D, Svetic B, Spaic D, Skrk J, Budihna J, Turk V. 1992. Determination of Cathepsins B, H, L and Kininogen in Breast Cancer Patients. *Agents Actions Suppl* 38(Pt 2):350-7.
- Gasparini G, Brooks PC, Biganzoli E, Vermeulen PB, Bonoldi E, Dirix LY, Ranieri G, Miceli R, Cheresch DA. 1998. Vascular Integrin Alpha(v)Beta3: a New Prognostic Indicator in Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 4(11):2625-34.
- Gazzerro E, Rydziel S, Canalis E. 1999. Skeletal Bone Morphogenetic Proteins Suppress the Expression of Collagenase-3 by Rat Osteoblasts. *Endocrinology* 140(2):562-7.
- Gerhold D, Rushmore T, Caskey CT. 1999. DNA Chips: Promising Toys Have Become Powerful Tools. *Trends Biochem Sci* 24(5):168-73.

- Glondou M, Liaudet-Coopman E, Derocq D, Platet N, Rochefort H, Garcia M. 2002. Down-Regulation of Cathepsin-D Expression by Antisense Gene Transfer Inhibits Tumor Growth and Experimental Lung Metastasis of Human Breast Cancer Cells. *Oncogene* 21(33):5127-34.
- Gobbi G, Sangiorgi L, Lenzi L, Casadei R, Canaider S, Strippoli P, Lucarelli E, Ghedini I, Donati D, Fabbri N, Warzecha J, Yeoung C, Helman LJ, Picci P, Carinci P. 2002. Seven BMPs and All Their Receptors Are Simultaneously Expressed in Osteosarcoma Cells. *Int J Oncol* 20(1):143-7.
- Goss PE, Sierra S. 1998. Current Perspectives on Radiation-Induced Breast Cancer. *J Clin Oncol* 16(1):338-47.
- Griffiths JR. 1991. Are Cancer Cells Acidic? *Br J Cancer* 64(3):425-7.
- Grigoriev MY, Pozharissky KM, Hanson KP, Imyanitov EN, Zhivotovsky B. 2002. Expression of Caspase-3 and -7 Does Not Correlate With the Extent of Apoptosis in Primary Breast Carcinomas. *Cell Cycle* 1(5):337-42.
- Harris SE, Harris MA, Mahy P, Wozney J, Feng JQ, Mundy GR. 1994. Expression of Bone Morphogenetic Protein Messenger RNAs by Normal Rat and Human Prostate and Prostate Cancer Cells. *Prostate* 24(4):204-11.
- Hedenfalk I, Duggan D, Chen Y, Radmacher M, Bittner M, Simon R, Meltzer P, Gusterson B, Esteller M, Kallioniemi OP, Wilfond B, Borg A, Trent J. 2001. Gene-Expression Profiles in Hereditary Breast Cancer. *N Engl J Med* 344(8):539-48.
- Helder MN, Ozkaynak E, Sampath KT, Luyten FP, Latin V, Oppermann H, Vukicevic S. 1995. Expression Pattern of Osteogenic Protein-1 (Bone Morphogenetic Protein-7) in Human and Mouse Development. *J Histochem Cytochem* 43(10):1035-44.
- Helder MN, Karg H, Bervoets TJ, Vukicevic S, Burger EH, D'Souza RN, Woltgens JH, Karsenty G, Bronckers AL. 1998. Bone Morphogenetic Protein-7 (Osteogenic Protein-1, OP-1) and Tooth Development. *J Dent Res* 77(4):545-54.
- Helm GA, Alden TD, Sheehan JP, Kallmes D. 2000. Bone Morphogenetic Proteins and Bone Morphogenetic Protein Gene Therapy in Neurological Surgery: a Review. *Neurosurgery* 46(5):1213-22.
- Henderson BE, Ross RK, Judd HL, Krailo MD, Pike MC. 1985. Do Regular Ovulatory Cycles Increase Breast Cancer Risk? *Cancer* 56(5):1206-8.
- Henderson IC. 1993. Risk Factors for Breast Cancer Development. *Cancer* 71(6 Suppl):2127-40.

- Herszenyi L, Plebani M, Carraro P, De Paoli M, Roveroni G, Cardin R, Tulassay Z, Naccarato R, Farinati F. 1999. The Role of Cysteine and Serine Proteases in Colorectal Carcinoma. *Cancer* 86(7):1135-42.
- Hiatt RA, Bawol RD. 1984. Alcoholic Beverage Consumption and Breast Cancer Incidence. *Am J Epidemiol* 120(5):676-83.
- Higinbotham KG, Karavanova ID, Diwan BA, Perantoni AO. 1998. Deficient Expression of mRNA for the Putative Inductive Factor Bone Morphogenetic Protein-7 in Chemically Initiated Rat Nephroblastomas. *Mol Carcinog* 23(2):53-61.
- Hogan BL, Blessing M, Winnier GE, Suzuki N, Jones CM. 1994. Growth Factors in Development: the Role of TGF-Beta Related Polypeptide Signalling Molecules in Embryogenesis. *Dev Suppl* 53-60.
- Hogan BL. 1996. Bone Morphogenetic Proteins in Development. *Curr Opin Genet Dev* 6(4):432-8.
- Hollnagel A, Oehlmann V, Heymer J, Ruther U, Nordheim A. 1999. Id Genes Are Direct Targets of Bone Morphogenetic Protein Induction in Embryonic Stem Cells. *J Biol Chem* 274(28):19838-45.
- Hulka BS, Stark AT. 1995. Breast Cancer: Cause and Prevention. *Lancet* 346(8979):883-7.
- Imai N, Iwai A, Hatakeyama S, Matsuzaki K, Kitagawa Y, Kato S, Hokari R, Kawaguchi A, Nagao S, Miyahara T, Itoh K, Miura S. 2001. Expression of Bone Morphogenetic Proteins in Colon Carcinoma With Heterotopic Ossification. *Pathol Int* 51(8):643-8.
- Imamura T, Takase M, Nishihara A, Oeda E, Hanai J, Kawabata M, Miyazono K. 1997. Smad6 Inhibits Signalling by the TGF-Beta Superfamily. *Nature* 389(6651):622-6.
- Ioachim E, Tsanou E, Briasoulis E, Batsis C, Karavasilis V, Charchanti A, Pavlidis N, Agnantis NJ. 2003. Clinicopathological Study of the Expression of Hsp27, PS2, Cathepsin D and Metallothionein in Primary Invasive Breast Cancer. *Breast* 12(2):111-9.
- Ishibashi O, Mori Y, Kurokawa T, Kumegawa M. 1999. Breast Cancer Cells Express Cathepsins B and L but Not Cathepsins K or H. *Cancer Biochem Biophys* 17(1-2):69-78.
- Johnson MD, Torri JA, Lippman ME, Dickson RB. 1993. The Role of Cathepsin D in the Invasiveness of Human Breast Cancer Cells. *Cancer Res* 53(4):873-7.

- Jones CM, Lyons KM, Hogan BL. 1991. Involvement of Bone Morphogenetic Protein-4 (BMP-4) and Vgr-1 in Morphogenesis and Neurogenesis in the Mouse. *Development* 111(2):531-42.
- Jones JL, Royall JE, Critchley DR, Walker RA. 1997. Modulation of Myoepithelial-Associated Alpha6beta4 Integrin in a Breast Cancer Cell Line Alters Invasive Potential. *Exp Cell Res* 235(2):325-33.
- Jones WK, Richmond EA, White K, Sasak H, Kusmik W, Smart J, Oppermann H, Rueger DC, Tucker RF. 1994. Osteogenic Protein-1 (OP-1) Expression and Processing in Chinese Hamster Ovary Cells: Isolation of a Soluble Complex Containing the Mature and Pro-Domains of OP-1. *Growth Factors* 11(3):215-25.
- Kane SE, Gottesman MM. 1990. The Role of Cathepsin L in Malignant Transformation. *Semin.Cancer Biol* 1(2):127-36.
- Kaneko H, Arakawa T, Mano H, Kaneda T, Ogasawara A, Nakagawa M, Toyama Y, Yabe Y, Kumegawa M, Hakeda Y. 2000. Direct Stimulation of Osteoclastic Bone Resorption by Bone Morphogenetic Protein (BMP)-2 and Expression of BMP Receptors in Mature Osteoclasts. *Bone* 27(4):479-86.
- Karadag A, Ogbureke KU, Fedarko NS, Fisher LW. 2004. Bone Sialoprotein, Matrix Metalloproteinase 2, and Alpha(v)Beta3 Integrin in Osteotropic Cancer Cell Invasion. *J Natl Cancer Inst* 96(12):956-65.
- Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M, Abe E, Takahashi N, Ikeda T, Rosen V, Wozney JM, Fujisawa-Sehara A, Suda T. 1994. Bone Morphogenetic Protein-2 Converts the Differentiation Pathway of C2C12 Myoblasts into the Osteoblast Lineage. *J Cell Biol* 127(6 Pt 1):1755-66.
- Kelsey JL, Berkowitz GS. 1988. Breast Cancer Epidemiology. *Cancer Res* 48(20):5615-23.
- Kelsey JL, Gammon MD. 1991. The Epidemiology of Breast Cancer. *CA Cancer J Clin* 41(3):146-65.
- Khan J, Saal LH, Bittner ML, Chen Y, Trent JM, Meltzer PS. 1999. Expression Profiling in Cancer Using CDNA Microarrays. *Electrophoresis* 20(2):223-9.
- Kim IY, Lee DH, Ahn HJ, Tokunaga H, Song W, Devereaux LM, Jin D, Sampath TK, Morton RA. 2000. Expression of Bone Morphogenetic Protein Receptors Type-IA, -IB and -II Correlates With Tumor Grade in Human Prostate Cancer Tissues. *Cancer Res* 60(11):2840-4.
- Kingsley DM. 1994. What Do BMPs Do in Mammals? Clues From the Mouse Short-Ear Mutation. *Trends Genet* 10(1):16-21.

- Kirker-Head CA. 2000. Potential Applications and Delivery Strategies for Bone Morphogenetic Proteins. *Adv Drug Deliv Rev* 43(1):65-92.
- Kiyozuka Y, Nakagawa H, Senzaki H, Uemura Y, Adachi S, Teramoto Y, Matsuyama T, Bessho K, Tsubura A. 2001. Bone Morphogenetic Protein-2 and Type IV Collagen Expression in Psammoma Body Forming Ovarian Cancer. *Anticancer Res* 21(3B):1723-30.
- Kleeff J, Maruyama H, Ishiwata T, Sawhney H, Friess H, Buchler MW, Korc M. 1999. Bone Morphogenetic Protein 2 Exerts Diverse Effects on Cell Growth in Vitro and Is Expressed in Human Pancreatic Cancer in Vivo. *Gastroenterology* 116(5):1202-16.
- Kohn EC, Liotta LA. 1995. Molecular Insights into Cancer Invasion: Strategies for Prevention and Intervention. *Cancer Res* 55(9):1856-62.
- Kolar Z, Jarvinen M, Negrini R. 1989. Demonstration of Proteinase Inhibitors Cystatin A, B and C in Breast Cancer and in Cell Lines MCF-7 and ZR-75-1. *Neoplasma* 36(2):185-9.
- Korchynsky O, Ten Dijke P. 2002. Bone morphogenetic protein receptors and their nuclear effectors in bone formation. Vukicevic, S. and Sampath, K. T. *Bone Morphogenetic Proteins - from Laboratory to Clinical Practice*. 1 ed. Basel, Boston, Berlin: Birkhäuser Verlag, pp.31-60.
- Korkola JE, DeVries S, Fridlyand J, Hwang ES, Estep AL, Chen YY, Chew KL, Dairkee SH, Jensen RM, Waldman FM. 2003. Differentiation of Lobular Versus Ductal Breast Carcinomas by Expression Microarray Analysis. *Cancer Res* 63(21):7167-75.
- Kos J, Lah TT. 1998. Cysteine Proteinases and Their Endogenous Inhibitors: Target Proteins for Prognosis, Diagnosis and Therapy in Cancer (Review). *Oncol Rep* 5(6):1349-61.
- Kuopio T, Kankaanranta A, Jalava P, Kronqvist P, Kotkansalo T, Weber E, Collan Y. 1998. Cysteine Proteinase Inhibitor Cystatin A in Breast Cancer. *Cancer Res* 58(3):432-6.
- Kurian KM, Watson CJ, Wyllie AH. 1999. DNA Chip Technology. *J Pathol* 187(3):267-71.
- Kute TE, Grondahl-Hansen J, Shao SM, Long R, Russell G, Brunner N. 1998. Low Cathepsin D and Low Plasminogen Activator Type 1 Inhibitor in Tumor Cytosols Defines a Group of Node Negative Breast Cancer Patients With Low Risk of Recurrence. *Breast Cancer Res Treat* 47(1):9-16.
- Ladd AN, Yatskievych TA, Antin PB. 1998. Regulation of Avian Cardiac Myogenesis by Activin/TGFbeta and Bone Morphogenetic Proteins. *Dev Biol* 204(2):407-19.

- Lah TT, Kokalj-Kunovar M, Drobnic-Kosorok M, Babnik J, Golouh R, Vrhovec I, Turk V. 1992. Cystatins and Cathepsins in Breast Carcinoma. *Biol Chem Hoppe Seyler* 373(7):595-604.
- Lah TT, Kokalj-Kunovar M, Strukelj B, Pungercar J, Barlic-Maganja D, Drobnic-Kosorok M, Kastelic L, Babnik J, Golouh R, Turk V. 1992. Stefins and Lysosomal Cathepsins B, L and D in Human Breast Carcinoma. *Int J Cancer* 50(1):36-44.
- Lah TT, Cercek M, Blejec A, Kos J, Gorodetsky E, Somers R, Daskal I. 2000. Cathepsin B, a Prognostic Indicator in Lymph Node-Negative Breast Carcinoma Patients: Comparison With Cathepsin D, Cathepsin L, and Other Clinical Indicators. *Clin Cancer Res* 6(2):578-84.
- Lah TT, Kalman E, Najjar D, Gorodetsky E, Brennan P, Somers R, Daskal I. 2000. Cells Producing Cathepsins D, B, and L in Human Breast Carcinoma and Their Association With Prognosis. *Hum Pathol* 31(2):149-60.
- Land CE. 1995. Studies of Cancer and Radiation Dose Among Atomic Bomb Survivors. The Example of Breast Cancer. *JAMA* 274(5):402-7.
- Langenfeld EM, Calvano SE, Abou-Nukta F, Lowry SF, Amenta P, Langenfeld J. 2003. The Mature Bone Morphogenetic Protein-2 Is Aberrantly Expressed in Non-Small Cell Lung Carcinomas and Stimulates Tumor Growth of A549 Cells. *Carcinogenesis* 24(9):1445-54.
- Laurent-Matha V, Farnoud MR, Lucas A, Rougeot C, Garcia M, Rochefort H. 1998. Endocytosis of Pro-Cathepsin D into Breast Cancer Cells Is Mostly Independent of Mannose-6-Phosphate Receptors. *J Cell Sci* 111 (Pt 17):2539-49.
- Leto G, Tumminello FM, Crescimanno M, Flandina C, Gebbia N. 2004. Cathepsin D Expression Levels in Nongynecological Solid Tumors: Clinical and Therapeutic Implications. *Clin Exp Metastasis* 21(2):91-106.
- Liapis H, Flath A, Kitazawa S. 1996. Integrin Alpha V Beta 3 Expression by Bone-Residing Breast Cancer Metastases. *Diagn Mol Pathol* 5(2):127-35.
- Lind M, Eriksen EF, Bunger C. 1996. Bone Morphogenetic Protein-2 but Not Bone Morphogenetic Protein-4 and -6 Stimulates Chemotactic Migration of Human Osteoblasts, Human Marrow Osteoblasts, and U2-OS Cells. *Bone* 18(1):53-7.
- Liotta LA, Mandler R, Murano G, Katz DA, Gordon RK, Chiang PK, Schiffmann E. 1986. Tumor Cell Autocrine Motility Factor. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 83(10):3302-6.
- Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. 1991. Tumor Invasion and Metastasis: an Imbalance of Positive and Negative Regulation. *Cancer Res* 51(18 Suppl):5054-9.

- Lipscomb EA, Dugan AS, Rabinovitz I, Mercurio AM. 2003. Use of RNA Interference to Inhibit Integrin (Alpha6beta4)-Mediated Invasion and Migration of Breast Carcinoma Cells. *Clin Exp Metastasis* 20(6):569-76.
- Lipworth L. 1995. Epidemiology of Breast Cancer. *Eur J Cancer Prev* 4(1):7-30.
- Littlewood-Evans AJ, Bilbe G, Bowler WB, Farley D, Wlodarski B, Kokubo T, Inaoka T, Sloane J, Evans DB, Gallagher JA. 1997. The Osteoclast-Associated Protease Cathepsin K Is Expressed in Human Breast Carcinoma. *Cancer Res* 57(23):5386-90.
- Liu F, Ventura F, Doody J, Massague J. 1995. Human Type II Receptor for Bone Morphogenic Proteins (BMPs): Extension of the Two-Kinase Receptor Model to the BMPs. *Mol Cell Biol* 15(7):3479-86.
- Liu Y, Belayev L, Zhao W, Busto R, Saul I, Alonso O, Ginsberg MD. 2001. The Effect of Bone Morphogenetic Protein-7 (BMP-7) on Functional Recovery, Local Cerebral Glucose Utilization and Blood Flow After Transient Focal Cerebral Ischemia in Rats. *Brain Res* 905(1-2):81-90.
- Lynch HT, Lynch JF. 1986. Breast Cancer Genetics in an Oncology Clinic: 328 Consecutive Patients. *Cancer Genet.Cytogenet* 22(4):369-71.
- Lyons KM, Pelton RW, Hogan BL. 1989. Patterns of Expression of Murine Vgr-1 and BMP-2a RNA Suggest That Transforming Growth Factor-Beta-Like Genes Coordinately Regulate Aspects of Embryonic Development. *Genes Dev* 3(11):1657-68.
- Lyons KM, Hogan BL, Robertson EJ. 1995. Colocalization of BMP 7 and BMP 2 RNAs Suggests That These Factors Cooperatively Mediate Tissue Interactions During Murine Development. *Mech Dev* 50(1):71-83.
- MacMahon B, Cole P, Brown J. 1973. Etiology of Human Breast Cancer: a Review. *J Natl Cancer Inst* 50(1):21-42.
- Maguire TM, Shering SG, Duggan CM, McDermott EW, O'Higgins NJ, Duffy MJ. 1998. High Levels of Cathepsin B Predict Poor Outcome in Patients With Breast Cancer. *Int J Biol Markers* 13(3):139-44.
- Maliakal JC, Asahina I, Hauschka PV, Sampath TK. 1994. Osteogenic Protein-1 (BMP-7) Inhibits Cell Proliferation and Stimulates the Expression of Markers Characteristic of Osteoblast Phenotype in Rat Osteosarcoma (17/2.8) Cells. *Growth Factors* 11(3):227-34.
- Martinovic S, Latin V, Suchanek E, Stavljenic-Rukavina A, Sampath KI, Vukicevic S. 1996. Osteogenic Protein-1 Is Produced by Human Fetal Trophoblasts in Vivo and Regulates the Synthesis of Chorionic Gonadotropin and Progesterone by Trophoblasts in Vitro. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 34(2):103-9.

- Massague J, Attisano L, Wrana JL 1994. The TGF-Beta Family and Its Composite Receptors. *Trends Cell Biol* 4(5):172-8.
- Masuda H, Fukabori Y, Nakano K, Takezawa Y, Csuzuki T, Yamanaka H. 2003. Increased Expression of Bone Morphogenetic Protein-7 in Bone Metastatic Prostate Cancer. *Prostate* 54(4):268-74.
- Miyazono K, Kusanagi K, Inoue H. 2001. Divergence and Convergence of TGF-Beta/BMP Signaling. *J Cell Physiol* 187(3):265-76.
- Montcourrier P, Silver I, Farnoud R, Bird I, Rochefort H. 1997. Breast Cancer Cells Have a High Capacity to Acidify Extracellular Milieu by a Dual Mechanism. *Clin. Exp Metastasis* 15(4):382-92.
- Morini M, Mottolese M, Ferrari N, Ghiorzo F, Buglioni S, Mortarini R, Noonan DM, Natali PG, Albini A. 2000. The Alpha 3 Beta 1 Integrin Is Associated With Mammary Carcinoma Cell Metastasis, Invasion, and Gelatinase B (MMP-9) Activity. *Int J Cancer* 87(3):336-42.
- Murnane MJ, Sheahan K, Ozdemirli M, Shuja S. 1991. Stage-Specific Increases in Cathepsin B Messenger RNA Content in Human Colorectal Carcinoma. *Cancer Res* 51(4):1137-42.
- Murphy MG, Mailhot J, Borke J, Wataha J, Sharawy M, Smith A. 2001. The Effects of RhBMP-2 on Human Osteosarcoma Cells and Human Gingival Fibroblasts in Vitro. *J Oral Implantol* 27(1):16-24.
- Nakanishi T, Kimura Y, Tamura T, Ichikawa H, Yamaai Y, Sugimoto T, Takigawa M. 1997. Cloning of a mRNA Preferentially Expressed in Chondrocytes by Differential Display-PCR From a Human Chondrocytic Cell Line That Is Identical With Connective Tissue Growth Factor (CTGF) mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 234(1):206-10.
- Nakao A, Afrakhte M, Moren A, Nakayama T, Christian JL, Heuchel R, Itoh S, Kawabata M, Heldin NE, Heldin CH, Ten Dijke P. 1997. Identification of Smad7, a TGFbeta-Inducible Antagonist of TGF-Beta Signalling. *Nature* 389(6651):631-5.
- Newman B, Austin MA, Lee M, King MC. 1988. Inheritance of Human Breast Cancer: Evidence for Autosomal Dominant Transmission in High-Risk Families. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 85(9):3044-8.
- Nohe A, Hassel S, Ehrlich M, Neubauer F, Sebald W, Henis YI, Knaus P. 2002. The mode of bone morphogenetic protein (BMP) receptor oligomerization determines different BMP-2 signaling pathways. *J Biol Chem* 277(7):5330-8.

- Ogata T, Wozney JM, Benezra R, Noda M. 1993. Bone Morphogenetic Protein 2 Transiently Enhances Expression of a Gene, Id (Inhibitor of Differentiation), Encoding a Helix-Loop-Helix Molecule in Osteoblast-Like Cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 90(19):9219-22.
- Olszewska D, Drewa T, Makarewicz R, Drewa J, Wozniak A, Maciak R. 2001. [Significance of Cathepsin B and D in Physiologic and Pathologic Processes]. *Pol Merkuriusz Lek* 10(55):65-70.
- Palosaari H, Ding Y, Larmas M, Sorsa T, Bartlett JD, Salo T, Tjaderhane L. 2002. Regulation and Interactions of MT1-MMP and MMP-20 in Human Odontoblasts and Pulp Tissue in Vitro. *J Dent Res* 81(5):354-9.
- Palosaari H, Pennington CJ, Larmas M, Edwards DR, Tjaderhane L, Salo T. 2003. Expression Profile of Matrix Metalloproteinases (MMPs) and Tissue Inhibitors of MMPs in Mature Human Odontoblasts and Pulp Tissue. *Eur J Oral Sci* 111(2):117-27.
- Parker S, Tomaselli MB. 1996. Streamlining Breast Disease Management. *J Healthc Resour Manag* 14(7):23-6.
- Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. 1999. Estimates of the Worldwide Incidence of 25 Major Cancers in 1990. *Int J Cancer* 80(6):827-41.
- Peters H, Balling R. 1999. Teeth. Where and How to Make Them. *Trends Genet* 15(2):59-65.
- Pfohler C, Fixemer T, Jung V, Dooley S, Remberger K, Bonkhoff H. 1998. In Situ Hybridization Analysis of Genes Coding Collagen IV Alpha1 Chain, Laminin Beta1 Chain, and S-Laminin in Prostate Tissue and Prostate Cancer: Increased Basement Membrane Gene Expression in High-Grade and Metastatic Lesions. *Prostate* 36(3):143-50.
- Phippard DJ, Weber-Hall SJ, Sharpe PT, Naylor MS, Jayatalake H, Maas R, Woo I, Roberts-Clark D, Francis-West PH, Liu YH, Maxson R, Hill RE, Dale TC. 1996. Regulation of Msx-1, Msx-2, Bmp-2 and Bmp-4 During Foetal and Postnatal Mammary Gland Development. *Development* 122(9):2729-37.
- Pignatelli M, Cardillo MR, Hanby A, Stamp GW. 1992. Integrins and Their Accessory Adhesion Molecules in Mammary Carcinomas: Loss of Polarization in Poorly Differentiated Tumors. *Hum Pathol* 23(10):1159-66.
- Pignatelli M, Stamp G. 1995. Integrins in Tumour Development and Spread. *Cancer Surv* 24:113-27.
- Premzl A, Puizdar V, Zavasnik-Bergant V, Kopitar-Jerala N, Lah TT, Katunuma N, Sloane BF, Turk V, Kos J. 2001. Invasion of Ras-Transformed Breast Epithelial Cells Depends on the Proteolytic Activity of Cysteine and Aspartic Proteinases. *Biol Chem* 382(5):853-7.

- Qian F, Bajkowski AS, Steiner DF, Chan SJ, Frankfater A. 1989. Expression of Five Cathepsins in Murine Melanomas of Varying Metastatic Potential and Normal Tissues. *Cancer Res* 49(17):4870-5.
- Rabinovitz I, Mercurio AM. 1996. The Integrin Alpha 6 Beta 4 and the Biology of Carcinoma. *Biochem Cell Biol* 74(6):811-21.
- Reddi AH. 1997. BMPs: Actions in Flesh and Bone. *Nat Med* 3(8):837-9.
- Reddi AH. 1998. Role of Morphogenetic Proteins in Skeletal Tissue Engineering and Regeneration. *Nat Biotechnol* 16(3):247-52.
- Reddi AH. 2000. Bone Morphogenetic Proteins and Skeletal Development: the Kidney-Bone Connection. *Pediatr Nephrol* 14(7):598-601.
- Reinholz MM, Iturria SJ, Ingle JN, Roche PC. 2002. Differential Gene Expression of TGF-Beta Family Members and Osteopontin in Breast Tumor Tissue: Analysis by Real-Time Quantitative PCR. *Breast Cancer Res Treat* 74(3):255-69.
- Ripamonti U, Duneas N. 1998. Tissue Morphogenesis and Regeneration by Bone Morphogenetic Proteins. *Plast Reconstr Surg* 101(1):227-39.
- Ripamonti U, Crooks J, Petit JC, Rueger DC. 2001. Periodontal Tissue Regeneration by Combined Applications of Recombinant Human Osteogenic Protein-1 and Bone Morphogenetic Protein-2. A Pilot Study in Chacma Baboons (*Papio Ursinus*). *Eur J Oral Sci* 109(4):241-8.
- Rocheffort H. 1992a. Cathepsin D in Breast Cancer: a Tissue Marker Associated With Metastasis. *Eur J Cancer* 28A(11):1780-3.
- Rocheffort H. 1992b. Biological and Clinical Significance of Cathepsin D in Breast Cancer. *Acta Oncol* 31(2):125-30.
- Rocheffort H. 1998. [Estrogens, Cathepsin D and Metastasis in Cancers of the Breast and Ovary: Invasion or Proliferation?]. *CR Seances Soc Biol Fil* 192(2):241-51.
- Rolli M, Fransvea E, Pilch J, Saven A, Felding-Habermann B. 2003. Activated Integrin Alpha6beta3 Cooperates With Metalloproteinase MMP-9 in Regulating Migration of Metastatic Breast Cancer Cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 100(16):9482-7.
- Rong S, Segal S, Anver M, Resau JH, Vande Woude GF. 1994. Invasiveness and Metastasis of NIH 3T3 Cells Induced by Met-Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor Autocrine Stimulation. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 91(11):4731-5.

- Ruoslahti E. 1999. Fibronectin and Its Integrin Receptors in Cancer. *Adv Cancer Res* 76:1-20.
- Ruppert R, Hoffmann E, Sebald W. 1996. Human Bone Morphogenetic Protein 2 Contains a Heparin-Binding Site Which Modifies Its Biological Activity. *Eur J Biochem* 237(1):295-302.
- Russo A, Bazan V, Migliavacca M, Zanna I, Tubiolo C, Tumminello FM, Dardanoni G, Cajozzo M, Bazan P, Modica G, Latteri M, Tomasino RM, Colucci G, Gebbia N, Leto G. 2000. Prognostic Significance of DNA Ploidy, S-Phase Fraction, and Tissue Levels of Aspartic, Cysteine, and Serine Proteases in Operable Gastric Carcinoma. *Clin Cancer Res* 6(1):178-84.
- Sameni M, Moin K, Sloane BF. 2000. Imaging Proteolysis by Living Human Breast Cancer Cells. *Neoplasia* 2(6):496-504.
- Scaddan PB, Dufresne MJ. 1993. Characterization of Cysteine Proteases and Their Endogenous Inhibitors in MCF-7 and Adriamycin-Resistant MCF-7 Human Breast Cancer Cells. *Invasion Metastasis* 13(6):301-13.
- Schwalbe M. 2000. Untersuchungen zur Expression von Knochenmorphogenesefaktoren in Zellen des Mammakarzinoms [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Scheufler C, Sebald W, Hulsmeyer M. 1999. Crystal Structure of Human Bone Morphogenetic Protein-2 at 2.7 Å Resolution. *J Mol Biol* 287(1):103-15.
- Schmitt JM, Hwang K, Winn SR, Hollinger JO. 1999. Bone Morphogenetic Proteins: an Update on Basic Biology and Clinical Relevance. *J Orthop Res* 17(2):269-78.
- Schultheiss TM, Burch JB, Lassar AB. 1997. A Role for Bone Morphogenetic Proteins in the Induction of Cardiac Myogenesis. *Genes Dev* 11(4):451-62.
- Schwartz MA, Ginsberg MH. 2002. Networks and Crosstalk: Integrin Signalling Spreads. *Nat Cell Biol* 4(4):E65-E68.
- Schwartz MK. 1995. Tissue Cathepsins As Tumor Markers. *Clin Chim Acta* 237(1-2):67-78.
- Shimizu H, Koyama N, Asada M, Yoshimatsu K. 2002. Aberrant Expression of Integrin and ErbB Subunits in Breast Cancer Cell Lines. *Int J Oncol* 21(5):1073-9.
- Siewerts AM, Klijn JG, Foekens JA. 1997. Assessment of the Invasive Potential of Human Gynecological Tumor Cell Lines With the in Vitro Boyden Chamber Assay: Influences of the Ability of Cells to Migrate Through the Filter Membrane. *Clin Exp Metastasis* 15(1):53-62.

- Sirard C, Kim S, Mirtsos C, Tadich P, Hoodless PA, Itie A, Maxson R, Wrana JL, Mak TW. 2000. Targeted Disruption in Murine Cells Reveals Variable Requirement for Smad4 in Transforming Growth Factor Beta-Related Signaling. *J Biol Chem* 275(3):2063-70.
- Sloane BF, Honn KV, Sadler JG, Turner WA, Kimpson JJ, Taylor JD. 1982. Cathepsin B Activity in B16 Melanoma Cells: a Possible Marker for Metastatic Potential. *Cancer Res* 42(3):980-6.
- Sloane BF. 1990. Cathepsin B and Cystatins: Evidence for a Role in Cancer Progression. *Semin Cancer Biol* 1(2):137-52.
- Sloane BF, Rozhin J, Robinson D, Honn KV. 1990a. Role for Cathepsin B and Cystatins in Tumor Growth and Progression. *Biol Chem Hoppe Seyler* 371 Suppl:193-8.
- Sloane BF, Moin K, Krepela E, Rozhin J. 1990b. Cathepsin B and Its Endogenous Inhibitors: the Role in Tumor Malignancy. *Cancer Metastasis Rev* 9(4):333-52.
- Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Eystein- Lonning P, Borresen-Dale AL. 2001. Gene Expression Patterns of Breast Carcinomas Distinguish Tumor Subclasses With Clinical Implications. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 98(19):10869-74.
- Spyratos F, Maudelonde T, Brouillet JP, Brunet M, Defrenne A, Andrieu C, Hacene K, Desplaces A, Rouesse J, Rochefort H. 1989. Cathepsin D: an Independent Prognostic Factor for Metastasis of Breast Cancer. *Lancet* 2(8672):1115-8.
- Sukoh N, Abe S, Ogura S, Isobe H, Takekawa H, Inoue K, Kawakami Y. 1994. Immunohistochemical Study of Cathepsin B. Prognostic Significance in Human Lung Cancer. *Cancer* 74(1):46-51.
- Sulzbacher I, Birner P, Trieb K, Pichlbauer E, Lang S. 2002. The Expression of Bone Morphogenetic Proteins in Osteosarcoma and Its Relevance As a Prognostic Parameter. *J Clin Pathol* 55(5):381-5.
- Tagliabue E, Ghirelli C, Squicciarini P, Aiello P, Colnaghi MI, Menard S. 1998. Prognostic Value of Alpha 6 Beta 4 Integrin Expression in Breast Carcinomas Is Affected by Laminin Production From Tumor Cells. *Clin Cancer Res* 4(2):407-10.
- Takahashi H, Ikeda T. 1996. Transcripts for Two Members of the Transforming Growth Factor-Beta Superfamily BMP-3 and BMP-7 Are Expressed in Developing Rat Embryos. *Dev Dyn* 207(4):439-49.

- Takase M, Imamura T, Sampath TK, Takeda K, Ichijo H, Miyazono K, Kawabata M. 1998. Induction of Smad6 mRNA by Bone Morphogenetic Proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 244(1):26-9.
- Takiguchi T, Kobayashi M, Suzuki R, Yamaguchi A, Isatsu K, Nishihara T, Nagumo M, Hasegawa K. 1998. Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 Stimulates Osteoblast Differentiation and Suppresses Matrix Metalloproteinase-1 Production in Human Bone Cells Isolated From Mandibulae. *J Periodontal Res* 33(8):476-85.
- Tamada H, Kitazawa R, Gohji K, Kitazawa S. 2001. Epigenetic Regulation of Human Bone Morphogenetic Protein 6 Gene Expression in Prostate Cancer. *J Bone Miner Res* 16(3):487-96.
- Tandon AK, Clark GM, Chamness GC, Chirgwin JM, McGuire WL. 1990. Cathepsin D and Prognosis in Breast Cancer. *N Engl J Med* 322(5):297-302.
- Tani T, Lumme A, Linnala A, Kivilaakso E, Kiviluoto T, Burgeson RE, Kangas L, Leivo I, Virtanen I. 1997. Pancreatic Carcinomas Deposit Laminin-5, Preferably Adhere to Laminin-5, and Migrate on the Newly Deposited Basement Membrane. *Am J Pathol* 151(5):1289-302.
- Ten Dijke P, Miyazono K, Heldin CH. 2000. Signaling Inputs Converge on Nuclear Effectors in TGF-Beta Signaling. *Trends Biochem Sci* 25(2):64-70.
- Terada T, Ohta T, Minato H, Nakanuma Y. 1995. Expression of Pancreatic Trypsinogen / Trypsin and Cathepsin B in Human Cholangiocarcinomas and Hepatocellular Carcinomas. *Hum Pathol* 26(7):746-52.
- Thesleff I. 1995. Homeobox Genes and Growth Factors in Regulation of Craniofacial and Tooth Morphogenesis. *Acta Odontol Scand* 53(3):129-34.
- Thesleff I, Vaahtokari A, Partanen AM. 1995. Regulation of Organogenesis. Common Molecular Mechanisms Regulating the Development of Teeth and Other Organs. *Int J Dev Biol* 39(1):35-50.
- Thomas BG, Hamdy FC. 2000. Bone Morphogenetic Protein-6: Potential Mediator of Osteoblastic Metastases in Prostate Cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 3(4):283-5.
- Thomssen C, Schmitt M, Goretzki L, Oppelt P, Pache L, Dettmar P, Janicke F, Graeff H. 1995. Prognostic Value of the Cysteine Proteases Cathepsins B and Cathepsin L in Human Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 1(7):741-6.
- Thorpe SM, Rochefort H, Garcia M, Freiss G, Christensen IJ, Khalaf S, Paolucci F, Pau B, Rasmussen BB, Rose C. 1989. Association Between High Concentrations of Mr 52,000 Cathepsin D and Poor Prognosis in Primary Human Breast Cancer. *Cancer Res* 49(21):6008-14.

- Urist MR. 1965. Bone Formation by Autoinduction. *Science* (150):893-9.
- Vainio S, Karavanova I, Jowett A, Thesleff I. 1993. Identification of BMP-4 As a Signal Mediating Secondary Induction Between Epithelial and Mesenchymal Tissues During Early Tooth Development. *Cell* 75(1):45-58.
- van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM, Roberts C, Linsley PS, Bernards R, Friend SH. 2002. Gene Expression Profiling Predicts Clinical Outcome of Breast Cancer. *Nature* 415(6871):530-6.
- Varghese S, Canalis E. 1997. Regulation of Collagenase-3 by Bone Morphogenetic Protein-2 in Bone Cell Cultures. *Endocrinology* 138(3):1035-40.
- Vukicevic S, Luyten FP, Reddi AH. 1990a. Osteogenin Inhibits Proliferation and Stimulates Differentiation in Mouse Osteoblast-Like Cells (MC3T3-E1). *Biochem Biophys Res Commun* 166(2):750-6.
- Vukicevic S, Paralkar VM, Cunningham NS, Gutkind JS, Reddi AH. 1990b. Autoradiographic Localization of Osteogenin Binding Sites in Cartilage and Bone During Rat Embryonic Development. *Dev Biol* 140(1):209-14.
- Vukicevic S, Latin V, Chen P, Batorsky R, Reddi AH, Sampath TK. 1994a. Localization of Osteogenic Protein-1 (Bone Morphogenetic Protein-7) During Human Embryonic Development: High Affinity Binding to Basement Membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 198(2):693-700.
- Vukicevic S, Helder MN, Luyten FP. 1994b. Developing Human Lung and Kidney Are Major Sites for Synthesis of Bone Morphogenetic Protein-3 (Osteogenin). *J Histochem Cytochem* 42(7):869-75.
- Vukicevic S, Kopp JB, Luyten FP, Sampath TK. 1996. Induction of Nephrogenic Mesenchyme by Osteogenic Protein 1 (Bone Morphogenetic Protein 7). *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 93(17):9021-6.
- Vukicevic S, Basic V, Rogic D, Basic N, Shih MS, Shepard A, Jin D, Dattatreya Murthy B, Jones W, Dorai H, Ryan S, Griffiths D, Maliakal J, Jelic M, Pastorcic M, Stavljenic A, Sampath TK. 1998. Osteogenic Protein-1 (Bone Morphogenetic Protein-7) Reduces Severity of Injury After Ischemic Acute Renal Failure in Rat. *J Clin Invest* 102(1):202-14.
- Waite KA, Eng C. 2003. BMP2 Exposure Results in Decreased PTEN Protein Degradation and Increased PTEN Levels. *Hum Mol Genet* 12(6):679-84.
- Walters MJ, Wayman GA, Christian JL. 2001. Bone Morphogenetic Protein Function Is Required for Terminal Differentiation of the Heart but Not for Early Expression of Cardiac Marker Genes. *Mech Dev* 100(2):263-73.

- Watanabe M, Higashi T, Hashimoto M, Tomoda I, Tominaga S, Hashimoto N, Morimoto S, Yamauchi Y, Nakatsukasa H, Kobayashi M. 1987. Elevation of Tissue Cathepsin B and L Activities in Gastric Cancer. *Hepatology* 34(3):120-2.
- Watanabe M, Higashi T, Watanabe A, Osawa T, Sato Y, Kimura Y, Tominaga S, Hashimoto N, Yoshida Y, Morimoto S. 1989. Cathepsin B and L Activities in Gastric Cancer Tissue: Correlation With Histological Findings. *Biochem Med Metab Biol* 42(1):21-9.
- Weaver VM, Lelievre S, Lakins JN, Chrenek MA, Jones JC, Giancotti F, Werb Z, Bissell MJ. 2002. Beta4 Integrin-Dependent Formation of Polarized Three-Dimensional Architecture Confers Resistance to Apoptosis in Normal and Malignant Mammary Epithelium. *Cancer Cell* 2(3):205-16.
- West M, Blanchette C, Dressman H, Huang E, Ishida S, Spang R, Zuzan H, Olson JA Jr, Marks JR, Nevins JR. 2001. Predicting the Clinical Status of Human Breast Cancer by Using Gene Expression Profiles. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 98(20):11462-7.
- Wingo PA, Ries LA, Rosenberg HM, Miller DS, Edwards BK. 1998. Cancer Incidence and Mortality, 1973-1995: a Report Card for the U.S. *Cancer* 82(6):1197-207.
- Wingo PA, Ries LA, Giovino GA, Miller DS, Rosenberg HM, Shopland DR, Thun MJ, Edwards BK. 1999. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1973-1996, With a Special Section on Lung Cancer and Tobacco Smoking. *J Natl Cancer Inst* 91(8):675-90.
- Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA. 1988. Novel Regulators of Bone Formation: Molecular Clones and Activities. *Science* 242(4885):1528-34.
- Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J. 1994. Mechanism of Activation of the TGF-Beta Receptor. *Nature* (6488):341-7.
- Yamada M, Revelli JP, Eichele G, Barron M, Schwartz RJ. 2000. Expression of Chick Tbx-2, Tbx-3, and Tbx-5 Genes During Early Heart Development: Evidence for BMP2 Induction of Tbx2. *Dev Biol* 228(1):95-105.
- Yanagawa T, Watanabe H, Shinozaki T, Nakajima T, Takagishi K. 2001. Expression of Bone Formation-Related Molecules in a Newly Established Protein-Independent Osteosarcoma. *Int J Oncol* 18(6):1195-205.
- Yano M, Hirai K, Naito Z, Yokoyama M, Ishiwata T, Shiraki Y, Inokuchi M, Asano G. 2001. Expression of Cathepsin B and Cystatin C in Human Breast Cancer. *Surg Today* 31(5):385-9.

Zhang SQ, Qiang SY, Yang WB, Jiang JT, Ji ZZ. 2004. [Expression of Survivin in Different Stages of Carcinogenesis and Progression of Breast Cancer]. *Ai.Zheng* 23(6):697-700.

Zheng WQ, Looi LM, Cheah PL. 2002. Correlation Between Laminin and Cathepsin D Expressions in Breast Carcinoma. *Tumori* 88(4):296-9.

8. ANHANG

8.1 Tabellen

T-47-D	1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch	MW norm.
1 ng BMP-2	65	27	223	15,5
10 ng BMP-2	49	24	189	13
50 ng BMP-2	26	32	250	14
FCS	34	16	166	9
NIH 3T3	4	1	70	1

BT-20	1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch	MW norm.
1 ng BMP-2	45	31	12	3
10 ng BMP-2	68	21	18	4,1
50 ng BMP-2	27	15	61	4,7
FCS	42	22	77	6,3
NIH 3T3	8	24	6	1

BT-474	1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch	MW norm.
1 ng BMP-2	29	9	22	6,4
10 ng BMP-2	14	24	9	3,1
50 ng BMP-2	9	11	20	2,9
FCS	8	23	11	2,2
NIH 3T3	2	45	5	1

MCF-7	1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch	MW norm.
1 ng BMP-2	60	31	21	1,9
10 ng BMP-2	110	20	24	2,8
50 ng BMP-2	86	40	33	2,8
FCS	49	25	36	1,9
NIH 3T3	17	27	18	1

Tab. 1: Daten der Einzelergebnisse der Transwell-Migrationsassays der Zelllinien T-47-D, BT-20, BT-474, MCF-7 und SK-BR-3 aus drei Versuchsreihen sowie die auf die Negativkontrolle (NIH 3T3) normierten Mittelwerte.

SK-BR-3	1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch	MW norm.
1 ng BMP-2	12	17	183	0,5
10 ng BMP-2	12	13	102	0,4
50 ng BMP-2	17	30	137	0,6
FCS	17	16	29	0,3
NIH 3T3	32	40	220	1

Tab. 2: Daten der Einzelergebnisse der Transwell-Migrationsassays der Zelllinien T-47-D, BT-20, BT-474, MCF-7 und SK-BR-3 aus drei Versuchsreihen sowie die auf die Negativkontrolle (NIH 3T3) normierten Mittelwerte.

MCF - 7	1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch	MW norm.
B 0,1	20	10	18	0,29
B 1	21	4	22	0,28
B 10	52	7	10	0,34
B 50	26	9	22	0,34
B 100	23	6	13	0,24
B 200	31	4	42	0,48
B 300	40	6	10	0,28
FCS	26	6	49	0,53
SK-BR-3	20	7	20	0,29
NIH 3T3	83	45	43	1

T-47-D	BMP-2	MW norm.	FCS	MW norm.	SF	MW norm.	SK-BR-3	MW norm.
1 1/2 h - a	3		4				0	
1 1/2 h - b	28	1,4	63	6		1	88	3,7
1 1/2 h - c	5		168				2	
2 h - a	22		8		6		7	
2 h - b	147	7,6	132	7,9	8	1	14	1,5
2 h - c	16		103		18		28	
2 1/2 h - a	53		10				0	
2 1/2 h - b	15	5	66	4		1	98	4,8
2 1/2 h - c	78		38				36	

BT-474	BMP-2	MW norm.	FCS	MW norm.	SF	MW norm.	SK-BR-3	MW norm.
1 1/2 h - a	29		6				4	
1 1/2 h - b	13	4,6	16	3,6	4	1	12	1,6
1 1/2 h - c	70		67				13	
2 h - a	127		85		7		0	
2 h - b	50	10,3	19	8,6	5	1	15	1,5
2 h - c	29		110		11		15	
2 1/2 h - a	26		6				19	
2 1/2 h - b	15	2,9	10	1,9		1		1,2
2 1/2 h - c	21		30				10	

Tab. 3: Daten der Einzelergebnisse der Boyden-Chamber-Invasionsassays der Zelllinien T-47-D, BT-474, BT-20, MCF-7 und SK-BR-3 aus drei Versuchsreihen (a, b und c) nach drei Auswertungszeitpunkten (1,5, 2 und 2,5 Stunden) sowie deren auf die Negativkontrolle (SF) normierten Mittelwerte.

Fortsetzung Tab. 3:

BT-20	BMP-2	MW norm.	FCS	MW norm.	SF	MW norm.	SK-BR-3	MW norm.
1 1/2 h - a	63		42				16	
1 1/2 h - b	16	21,9	19	16,6		1	14	7
1 1/2 h - c	14		49				31	
2 h - a	9		33		1		15	
2 h - b	40	4,8	46	12,8	22	1	38	6,1
2 h - c	25		24		7		10	
2 1/2 h - a	148		166				14	
2 1/2 h - b	21	51,1	29	56,6		1	26	5,9
2 1/2 h - c	30		18				17	

MCF - 7	BMP-2	MW norm.	FCS	MW norm.	SF	MW norm.	SK-BR-3	MW norm.
1 1/2 h - a			0				3	
1 1/2 h - b	94	12,5	47	2,4			25	1,3
1 1/2 h - c	66		13				8	
2 h - a	5		5		9		4	
2 h - b	81	13,9	48	14,4	31	1	28	3,7
2 h - c	116		123		3		29	
2 1/2 h - a	9		3				6	
2 1/2 h - b	85	6,4	37	1,1			78	2,1
2 1/2 h - c	46		5				10	

SK-BR-3	BMP-2	MW norm.	FCS	MW norm.	SF	MW norm.	SK-BR-3	MW norm.
1 1/2 h - a	9		17				2	
1 1/2 h - b	31	8,3	5	7,4		1	5	2,5
1 1/2 h - c	2		16				18	
2 h - a	107		216		1		19	
2 h - b	40	42,7	12	76,3	2	1	13	8,8
2 h - c	6		42		6		6	
2 1/2 h - a	12		7				1	
2 1/2 h - b	79	17,4	6	4		1	147	25,3
2 1/2 h - c	5		12				9	

Tab. 4: Tabellarische Auflistung der reproduzierbar veränderten Gene sowie ausgewählter Gene nach 5-stündiger Inkubation der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 mit BMP-2 im Vergleich zur 0-Stunden Kontrolle.

Gene name	MCF7- BMP2- 5h_A	MCF7- BMP2- 5h_A	MCF7- sf- 0h_A	MCF7 -sf- 0h_A	MCF7- BMP2- 5h_B	MCF7- BMP2- 5h_B	MCF7- sf- 0h_B	MCF7 -sf- 0h_B	MCF7_A	MCF7_A	MCF7_B	MCF7_B	MCF-7_A+B
	[MW] 5h BMP2	[Rank] 5h BMP2	[MW] 0h sf	[Rank] 0h sf	[MW] 5h BMP2	[Rank] 5h BMP2	[MW] 0h sf	[Rank] 0h sf	[logratio] 5h BMP2/sf	[rankchange] 5h BMP2-sf	[logratio] 5h BMP2/sf	[rankchange] 5h BMP2-sf	[MW_logratio] 5h BMP2/sf
Cathep. K	0,01	32	0,06	21	0,01	26	0,02	34	-2,09	11	-1,47	-8	-1,78
Cathep. B	0,03	19	0,07	20	0,01	24	0,03	30	-1,09	-1	-1,47	-6	-1,28
Cathep. H	0,01	35	0,05	23	0,01	40	0,01	28	-1,94	12	-0,55	12	-1,24
Cathep. D	0,34	13	0,69	6	0,56	6	0,83	4	-1,00	7	-0,57	2	-0,79
TIMP 2	0,01	29	0,03	24	0,01	36	0,01	29	-1,33	5	-0,12	7	-0,72
Cystat. C	0,58	8	0,30	15	0,17	14	0,10	13	0,97	-7	0,76	1	0,86
Caspa. 7	0,01	37	0,09	16	0,03	23	0,02	17	-3,06	21	0,24	6	-1,41
Cystat. A	0,02	22	0,02	29	0,01	38		33	0,05	-7		5	0,05
Integrin beta4		54		34	0,05	17	0,05	14		20	0,13	3	0,13
Integrin beta5		52	0,01	36		28		32		16		-4	

Tab. 5: Tabellarische Auflistung der reproduzierbar veränderten Gene sowie ausgewählter Gene nach 24-stündiger Inkubation der Mammarkarzinomzelllinie MCF-7 mit BMP-2 im Vergleich zur 0-Stunden Kontrolle.

Gene name	MCF7-BMP2-24h_A	MCF7-BMP2-24h_A	MCF7-sf-0h_A	MCF7-sf-0h_A	MCF7-BMP2-24h_B	MCF7-BMP2-24h_B	MCF7-sf-0h_B	MCF7-sf-0h_B	MCF7_A	MCF7_A	MCF7_B	MCF7_B	MCF-7_A+B
	[MW]	[Rank]	[MW]	[Rank]	[MW]	[Rank]	[MW]	[Rank]	[logratio]	[rankchange]	[logratio]	[rankchange]	[MW_logratio]
	24h	24h	0h	0h	24h	24h	0h	0h	24h	24h	24h	24h	24h
	BMP2	BMP2	sf	sf	BMP2	BMP2	sf	sf	BMP2/sf	BMP2-sf	BMP2/sf	BMP2-sf	BMP2/sf
ADAM 15	0,09	20	0,02	31	0,00	19	0,06	53	-1,95	-11	-6,29	-34	-4,12
Cathep. K	0,07	22	0,06	21	0,01	23	0,03	34	-0,40	1	-2,16	-11	-1,28
Cathep. H	0,08	21	0,05	23	0,01	29	0,02	28	-0,71	-2	-0,69	1	-0,70
Pro 1073	0,06	24	0,02	32	0,00	15	0,27	40	-1,58	-8	-5,83	-25	-3,71
Cystat. C	0,39	13	0,30	15	0,10	7	0,74	13	-0,39	-2	-2,86	-6	-1,63
Cathep. D	0,69	7	0,69	6	0,83	12	0,68	4	0,00	1	0,30	8	0,15
Integrin beta5	0,07	23	0,01	36		31	0,01	32	-2,26	-13		-1	-2,26
Cathep. B	0,25	15	0,07	20	0,01	30		30	-1,85	-5		0	-1,85
Cystat. A	0,03	32	0,02	29		24	0,03	33	-0,14	3		-9	-0,14
Caspa. 7	0,03	31	0,09	16	0,02	20	0,04	17	1,76	15	-0,95	3	0,41
Integrin beta4	0,06	25		34	0,05	17	0,10	14		-9	1,12	3	1,12

Tab. 6: Tabellarische Auflistung der reproduzierbar veränderten Gene sowie ausgewählter Gene nach 5-stündiger serumfreier Inkubation der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 im Vergleich zur 0-Stunden Serumfreikontrolle.

Gene name	MCF7-sf-5h_A	MCF7-sf-5h_A	MCF7-sf-0h_A	MCF7-sf-0h_A	MCF7-sf-5h_B	MCF7-sf-5h_B	MCF7-sf-0h_B	MCF7-sf-0h_B	MCF7_A	MCF7_A	MCF7_B	MCF7_B	MCF-7_A+B
	[MW]	[Rank]	[MW]	[Rank]	[MW]	[Rank]	[MW]	[Rank]	[logratio]	[rankgchange]	[logratio]	[rankchange]	[MW_logratio]
	5h	5h	0h	0h	5h	5h	0h	0h	5h	5h	5h	5h	5h
	sf	sf	sf	sf	sf	sf	sf	sf	sf5/0	sf5-sf0	sf5/0	sf5-sf0	sf5/0
Cathep. D	0,96	4	0,69	6	1,19	4	0,83	4	0,48	-2	0,52	0	0,50
Cathep. Z	0,63	9	0,57	10	0,65	8	0,26	9	0,13	-1	1,34	-1	0,74
Cystat. C	0,40	14	0,30	15	0,25	13	0,10	13	0,41	-1	1,28	0	0,85
CEA	0,03	28	0,01	40	0,04	28	0,02	18	1,34	-12	0,82	10	1,08
Cathep. K	0,07	22	0,06	21	0,05	24	0,01	34	0,30	1	2,94	-10	1,62
uPA	0,08	20	0,07	18	0,12	17	0,01	35	0,13	2	4,41	-18	2,27
TIMP 2	0,08	21	0,03	24	0,12	16	0,01	29	1,12	-3	3,69	-13	2,40
Cathep. H	0,15	18	0,05	23	0,09	21	0,01	28	1,69	-5	3,20	-7	2,44
Cathep. F	0,09	19	0,03	25	0,04	27	0,00	41	1,58	-6	3,37	-14	2,48
Cathep. B	0,23	16	0,07	20	0,10	19	0,01	30	1,71	-4	3,40	-11	2,56
ADAM 15	0,03	30	0,02	31	0,09	20	0,00	53	0,36	-1	7,05	-33	3,71
ADAM 10	0,03	27	0,02	33	0,03	35	0,00	42	0,82	-6	3,07	-7	1,94
Caspa. 7	0,07	23	0,09	16	0,05	25	0,02	17	-0,44	7	1,15	8	0,35
Cystat. B	0,35	15	0,42	13	0,19	14	0,04	15	-0,26	2	2,31	-1	1,03
Integrin beta4	0,03	32		34	0,05	18	0,10	14		-2	-1,10	4	-1,10
Integrin beta5	0,04	26	0,01	36	0,05	26		32	1,37	-10		-6	1,37
Cystat. A		42	0,02	29	0,02	43		33		13		10	

Tab. 7: Tabellarische Auflistung der reproduzierbar veränderten Gene sowie ausgewählter Gene nach 24-stündiger serumfreier Inkubation der Mammakarzinonzelllinie MCF-7 im Vergleich zur 0-Stunden Serumfreikontrolle.

Gene name	MCF7-sf- 24h_A	MCF7-sf- 24h_A	MCF7- sf- 0h_A	MCF7 -sf- 0h_A	MCF7-sf- 24h_B	MCF7- sf- 24h_B	MCF7- sf- 0h_B	MCF7 -sf- 0h_B	MCF7_A	MCF7_A	MCF7_B	MCF7_B	MCF7_A+B
	[MW] 24h sf	[Rank] 24h sf	[MW] 0h sf	[Rank] 0h sf	[MW] 24h sf	[Rank] 24h sf	[MW] 0h sf	[Rank] 0h sf	[logratio] 24h sf24/0	[rankchange] 24h sf24-sf0	[logratio] 24h sf24/0	[rankchange] 24h sf24-sf0	[MW_logratio] 24h sf24/0
Cathep. D	0,69	8	0,45	6	0,83	12	0,70	4	0,60	2	0,25	8	0,43
Cathep. F	0,03	22	0,03	25	0,11	25	0,00	41	0,19	-3	4,75	-16	2,47
ADAM 10	0,03	23	0,02	33	0,10	29	0,00	42	0,66	-10	4,72	-13	2,69
Pro 1073	0,02	25	0,02	32	0,24	19	0,00	40	0,11	-7	5,69	-21	2,90
Cystat. C	0,30	13	0,17	15	0,10	14	0,61	13	0,84	-2	-2,59	1	-0,88
Cathep. B	0,07	16	0,07	20	0,26	18	0,01	30	-0,03	-4	4,87	-12	2,42
Caspa. 7	0,00	63	0,09	16		30	0,02	17	-5,21	47		13	-5,21
Integrin beta4		58		34	0,04	39	0,05	14		24	-0,29	25	-0,29
Integrin beta 5	0,01	32	0,01	36	0,03	41		32	-0,01	-4		9	-0,01
Cystat. A	0,02	27	0,02	29	0,11	26		33	0,09	-2		-7	0,09
Cathep. H	0,05	18	0,05	23		31	0,01	28	0,11	-5		3	0,11
Cathep. K	0,06	19	0,05	21		17	0,01	34	0,19	-2		-17	0,19

Tab. 8: Tabellarische Auflistung der reproduzierbar veränderten Gene sowie ausgewählter Gene nach 5-stündiger Inkubation der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 mit BMP-2 im Vergleich zur 5-stündigen Inkubation mit serumfreiem Medium.

Gene name	MCF7-BMP2-5h_A	MCF7-BMP2-5h_A	MCF7-sf-5h_A	MCF7-sf-5h_A	MCF7-BMP2-5h_B	MCF7-BMP2-5h_B	MCF7-sf-5h_B	MCF7-sf-5h_B	MCF7_A		MCF7_B		MCF7_A+B
	[MW]	[Rank]	[MW]	[Rank]	[MW]	[Rank]	[MW]	[Rank]	[logratio]	[rankchange]	[logratio]	[rankchange]	[MW_logratio]
	5h	5h	5h	5h	5h	5h	5h	5h	5h	5h	5h	5h	5h
	BMP2	BMP2	sf	sf	BMP2	BMP2	sf	sf	BMP2/sf	BMP2-sf	BMP2/sf	BMP2-sf	BMP2/sf
Cathep. H	0,01	35	0,15	18	0,01	40	0,09	21	-3,63	17	-3,75	19	-3,69
TIMP 2	0,01	29	0,08	21	0,01	36	0,12	16	-2,45	8	-3,81	20	-3,13
Cathep. B	0,03	19	0,23	16	0,03	24	0,10	19	-2,80	3	-1,93	5	-2,37
TIMP 1	0,07	16	0,43	12	0,03	22	0,15	15	-2,58	4	-2,10	7	-2,34
Cathep. F	0,01	27	0,09	19	0,01	29	0,04	27	-2,64	8	-1,72	2	-2,18
Cathep. K	0,01	32	0,07	22	0,02	26	0,05	24	-2,39	10	-1,47	2	-1,93
Caspa. 7	0,01	37	0,07	23	0,03	23	0,05	25	-2,61	14	-0,91	-2	-1,76
Cathep. D	0,34	13	0,96	4	0,56	6	1,19	4	-1,49	9	-1,09	2	-1,29
uPA	0,04	18	0,08	20	0,05	19	0,12	17	-0,97	-2	-1,31	2	-1,14
Cathep. Z	0,42	12	0,63	9	0,30	11	0,65	8	-0,57	3	-1,11	3	-0,84
Cystat. B	0,21	14	0,35	15	0,10	16	0,19	14	-0,70	-1	-0,92	2	-0,81
Integrin beta 1	0,07	15	0,20	17	0,04	20	0,04	29	-1,47	-2	0,00	-9	-0,74
Emmpr.	0,42	11	0,43	13	0,29	12	0,51	11	-0,01	-2	-0,81	1	-0,41
Emmpr. II	0,50	9	0,52	10	0,45	9	0,55	10	-0,08	-1	-0,30	-1	-0,19
EF1alpha	1,16	3	1,27	2	1,37	2	1,58	1	-0,13	1	-0,21	1	-0,17
Bikunin	0,46	10	0,52	11	0,44	10	0,48	12	-0,20	-1	-0,14	-2	-0,17
Ubiquit.	0,98	5	0,92	6	0,83	5	0,78	6	0,10	-1	0,10	-1	0,10
Cystat. C	0,58	8	0,40	14	0,17	14	0,25	13	0,56	-6	-0,52	1	0,02
Cystat. A	0,02	22		42	0,01	38	0,02	43		-20	-1,57	-5	-1,57
Integrin beta4		54	0,03	32	0,10	17	0,05	18		22	0,97	-1	0,97
Integrin beta5		52	0,04	26		28	0,05	26		26		2	

Tab. 9:
Tabellarische Auflistung der reproduzierbar veränderten Gene sowie ausgewählter Gene nach 24-stündiger Inkubation der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 mit BMP-2 im Vergleich zur 24-stündigen Inkubation mit serum-freiem Medium.

Gene name	MCF7-BMP2-24h_A	MCF7-BMP2-24h_A	MCF7-sf-24h_A	MCF7-sf-24h_A	MCF7-BMP2-24h_B	MCF7-BMP2-24h_B	MCF7-sf-24h_B	MCF7-sf-24h_B	MCF7_A	MCF7_A	MCF7_B	MCF7_B	MCF7_A+B
	[MW]	[Rank]	[MW]	[Rank]	[MW]	[Rank]	[MW]	[Rank]	[logratio]	[rankchange]	[logratio]	[rankchange]	[MW_logratio]
	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h
	BMP2	BMP2	sf	sf	BMP2	BMP2	sf	sf	BMP2/sf	BMP2-sf	BMP2/sf	BMP2-sf	BMP2/sf
TIMP 2	0,02	30	0,03	26	0,02	27	0,16	21	-0,53	4	-2,91	6	-1,72
Cystat. A	0,02	32	0,03	27	0,03	24	0,11	26	-0,23	5	-1,97	-2	-1,10
Cystat. B	0,06	16	0,16	17	0,47	14	0,64	13	-1,48	-1	-0,45	1	-0,97
Emmpr. II	0,38	9	0,62	9	0,58	13	0,78	8	-0,73	0	-0,44	5	-0,59
Bikunin	0,31	11	0,54	12	0,72	8	0,81	7	-0,82	-1	-0,16	1	-0,49
Emmpr.	0,33	10	0,61	10	0,69	11	0,73	11	-0,89	0	-0,08	0	-0,49
Cathep. D	0,45	7	0,69	8	0,68	12	0,70	12	-0,60	-1	-0,04	0	-0,32
Cathep. Z	0,31	12	0,45	11	0,71	10	0,77	9	-0,53	1	-0,11	1	-0,32
Ubiquit.	0,56	8	0,67	7	1,03	4	1,04	5	-0,24	1	-0,02	-1	-0,13
EF1alpha	1,03	4	1,05	3	1,25	2	1,31	1	-0,04	1	-0,07	1	-0,05
Integrin alphav	0,00	37	0,01	55	0,00	44	0,02	45	-1,32	-18	-2,55	-1	-1,93
Caspa. 6	0,01	36	0,01	36	0,01	35	0,10	28	-0,28	0	-3,49	7	-1,89
Integrin beta5	0,01	23	0,07	32	0,01	31	0,03	41	-2,27	-9	-1,40	-10	-1,84
Cystat. C	0,17	13	0,39	13	0,74	7	0,61	14	-1,23	0	0,27	-7	-0,48
Caspa. 7	0,00	31	0,03	63	0,04	20		30	-3,45	-32		-10	-3,45
Cathep. B	0,07	15	0,25	16		30	0,26	18	-1,88	-1		12	-1,88
Cathep. H	0,05	21	0,08	18	0,02	29		31	-0,60	3		-2	-0,60
Cathep. K	0,05	22	0,07	19	0,03	23		17	-0,59	3		6	-0,59
Integrin beta4		25	0,06	58	0,10	17	0,04	39		-33	1,42	-22	1,42

	MW	korr. MW	korr.X/korr.Aktin	Ratio		MW	korr. MW	korr.X/korr.Aktin	Ratio
<u>Aktin</u>					Versuch 2				
Versuch 1					BMP 5h	49611	1,19018516		
BMP 5h	43782	1,06178248			SF 5h	49392	1,1850913		
BMP 24h	43765	1,06142903			BMP 24h	49533	1,1883684		
SF 24h	43382	1,05349705			SF 24h	49998	1,19924022		
	43054	1,04675127							
<u>Cathepsin B</u>					Versuch 2				
Versuch 1					BMP 5h	31830	0,84018895	0,705931291	0,97
BMP 5h	20954	0,67900093	0,639491554	0,91	SF 5h	33079,5	0,86100302	0,72652885	
SF 5h	25785	0,74638136	0,703185366		BMP 24h	29445	0,80184638	0,674745628	0,98
BMP 24h	31998	0,84295793	0,800152145	0,98	SF 24h	30832	0,82392637	0,687040306	
SF 24h	32958	0,85895665	0,82059289						
<u>Cathepsin D</u>					Versuch 2				
Versuch 1					BMP 5h	40337,5	0,99251736	0,83391845	0,93
BMP 5h	33022	0,86003397	0,809990733	0,94	SF 5h	43691	1,05989184	0,894354583	
SF 5h	36062	0,91279351	0,859966597		BMP 24h	39301,5	0,97258225	0,818418137	0,97
BMP 24h	35454	0,90198882	0,856185422	0,97	SF 24h	41067,5	1,00680921	0,839539228	
SF 24h	36423	0,91926993	0,878212381						
<u>Cathepsin H</u>					Versuch 2				
Versuch 1					BMP 5h	47768	1,14799174	0,964548859	0,95
BMP 5h	9540	0,74606714	0,424237512	1,00	SF 5h	50396	1,20862453	1,019857734	
SF 5h	24347	0,91462773	0,424378782		BMP 24h	29594	0,8041897	0,676717503	0,99
BMP 24h	10580	0,68685868	0,427574007	0,99	SF 24h	30571	0,81972551	0,683537368	
SF 24h	26765	0,81383084	0,430329505						
<u>Cathepsin K</u>					Versuch 2				
Versuch 1					BMP 5h	53819	1,29242686	1,08590403	0,94
BMP 5h	41833	0,78339772	0,424237512	1,00	SF 5h	56694	1,3672864	1,153739292	
SF 5h	47723	0,84664752	0,424378782		BMP 24h				
BMP 24h		0,55969883	0,427574007	0,99	SF 24h				
SF 24h		0,59441809	0,430329505						

Tab. 10: Tabellarische Darstellung der quantitativen, mit dem Programm LabImage ermittelten Intensitäten der PCR-Daten sowie deren rechnerische Auswertung nach Normalisierung auf Aktin.

	MW	korr. MW	korr.X/korr.Aktin	Ratio		MW	korr. MW	korr.X/korr.Aktin	Ratio
<u>Cystatin A</u>					<u>Versuch 2</u>				
BMP 5h	29700	0,80586092	0,758969881	0,90	BMP 5h	25093	0,73633413	0,618671909	1,03
SF 5h	34895	0,89216779	0,840534571		SF 5h	23094,5	0,70807057	0,597481872	
BMP 24h	18689	0,64953902	0,61655514	0,83	BMP 24h	11219	0,56113664	0,472190813	0,95
SF 24h	27599	0,77337458	0,738833182		SF 24h	14197,5	0,59484316	0,496016686	
<u>Cystatin C</u>					<u>Versuch 2</u>				
BMP 5h	28198	0,78250069	0,736968921	0,96	BMP 5h	25802	0,7466299	0,627322476	0,95
SF 5h	30227	0,81422144	0,767099276		SF 5h	27948	0,77867877	0,657062262	
BMP 24h	25432	0,74123909	0,70359864	0,96	BMP 24h	22438	0,69902488	0,588222374	0,96
SF 24h	27150	0,76660366	0,732364679		SF 24h	24882	0,73329758	0,611468467	
<u>Caspase 7</u>					<u>Versuch 2</u>				
BMP 5h	35398	0,90100011	0,848573155	0,98	BMP 5h	27451,5	0,77114371	0,647919108	1,03
SF 5h	36158	0,9145113	0,861584976		SF 5h	25485	0,7420089	0,626119604	
BMP 24h	35899	0,90988422	0,863679891	0,94	BMP 24h	24680	0,73040229	0,614626146	1,01
SF 24h	38844	0,9639068	0,920855622		SF 24h	24721,5	0,73099618	0,609549419	
<u>Integrin β4</u>					<u>Versuch 2</u>				
BMP 5h	57113	1,37855256	1,298338017	1,07	BMP 5h	40572,5	0,99709588	0,837765346	1,06
SF 5h	53795	1,29181952	1,217056899		SF 5h	37286	0,93493918	0,78891743	
BMP 24h	38885	0,9646811	0,915694161	0,97	BMP 24h	28295	0,78398864	0,659718514	0,99
SF 24h	40074	0,98740858	0,943307738		SF 24h	29331	0,80005813	0,6671375	
<u>Integrin β5</u>					<u>Versuch 2</u>				
BMP 5h	58016	1,40314922	1,321503461	0,80	BMP 5h	51209	1,22802281	1,031791399	0,99
SF 5h	69307	1,75041194	1,649108795		SF 5h	51433,5	1,23343405	1,040792429	
BMP 24h	72658	1,86914261	1,774226705	0,94	BMP 24h	38543	0,95824126	0,806350332	1,02
SF 24h	75575	1,9790337	1,890643698		SF 24h	37900	0,94624976	0,789041046	

Tab. 11: Tabellarische Darstellung der quantitativen, mit dem Programm LabImage ermittelten Intensitäten der PCR-Daten sowie deren rechnerische Auswertung nach Normalisierung auf Aktin.

8.2 Veröffentlichungen

Originalarbeiten

Clement JH, Raida M, Sängler J, Bicknell R, Liu J, Naumann A, Geyer A, Waldau A, Horschansky P, Schmidt A, Höffken K, Wölfl S, Harris AL. 2005. Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) induces *in vitro* invasion and *in vitro* hormone independent growth of breast carcinoma cells. Int J Oncol 27:401-407.

Steinert S, Ludwig M, Naumann A, Geyer A, Clement JH. 2005. BMP-2 reguliert das Migrationsverhalten von Mammakarzinomzellen *in vitro*. Biospektrum 4/2005:470-472.

Abstracts

Clement JH, Odyvanova L, Hortschansky P, Meissner A, Kroll T, Geyer A, Wölfl S, Höffken K. 2001. Action of BMP-2 on breast cancer cells: Enhancement of migratory and invasive properties. J Cancer Res Clin Oncol 127(Suppl): S63.

Wölfl S, Odyvanova L, Geyer A, Frenzel T, Kühnemund A, Lichtenberg M, Hortschansky P, Clement JH. 2001. Activation of SMAD-signaling pathway modulates the biological properties of breast cancer cell lines. STS-Jahrestagung, Weimar, 08.-10.11.2001.

Wölfl S, Naumann A, Kroll T, Odyvanova L, Geyer A, Hortschansky P, Schwalbe M, Höffken K, Clement JH. 2001. BMP-2 enhances the migratory and invasive properties of breast cancer cells. Cell Migration in Development and Disease, Berlin, 28.11.-01.12.2001.

Geyer A, Naumann A, Kroll T, Odyvanova L, Hortschansky P, Wölfl S, Höffken K, Clement JH. 2002. Mammakarzinom-Zelllinien zeigen in Gegenwart von Knochenmorphogenesefaktor 2 (BMP-2) veränderte migratorische und invasive Eigenschaften. Medizinische Klinik 97:99(#073), Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, 06.-10.04.2002, Wiesbaden.

Geyer A, Wenz I, Kroll T, Hortschansky P, Naumann A, Wölfl S, Höffken K, Clement JH. 2002. BMP-2 enhances invasive properties and modulates proteolytic activity of breast cancer cell lines. J Cancer Res Clin Oncol. 128(Suppl.1):57(#P293), Deutscher Krebskongress, 10.-14.03.2002, Berlin.

Wölfl S, Naumann A, Kroll T, Odyvanova L, Geyer A, Hortschansky P, Schwalbe M, Höffken K, Clement JH. 2002. BMP-2 effects on breast cancer cell lines – a progress report. Second European Conference on Bone Morphogenetic Proteins 22.-25.05.2002, Zagreb.

Clement JH, Raida M, Sängler J, Bicknell R, Liu J, Naumann A, Geyer A, Waldau A, Hortschansky P, Schmidt A, Höffken K, Wölfl S, Harris AL. 2004. Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) induces in vitro invasion and in vivo hormone independent growth of breast carcinoma cells. AACR, Orlando, 2004.

Clement JH, Raida M, Sängler J, Bicknell R, Liu J, Naumann A, Geyer A, Waldau A, Hortschansky P, Schmidt A, Wölfl S, Harris AL, Höffken K. 2004. BMP-2 überexprimierende Mammakarzinomzellen zeigen ein Östrogen-unabhängiges Wachstum. DGIM 2004.

Vorträge

Wölfl S, Geyer A, Odyvanova L, Kroll T, Hortschansky P, Schwalbe M, Naumann A, Höffken K, Clement JH. 2002. Effect of BMP-2 on the migratory and invasive properties of breast cancer cells. GBM 2002, Halle.

Clement JH, Raida M, Sängler J, Bicknell R, Liu J, Naumann A, Geyer A, Waldau A, Hortschansky P, Schmidt A, Wölfl S, Harris AL, Höffken K. 2004. Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) induces in vitro invasion and in vivo hormone independent growth of breast carcinoma cells. 26. Deutscher Krebskongress, Berlin, 27.02.-01.03.2004.

8.3 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Klaus Höffken für die freundliche Überlassung des Themas meiner Doktorarbeit.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Dr. rer. biol. hum. Joachim Clement bedanken, der mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Außerdem gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. rer. nat. Stefan Wölfl, Herrn Dr. rer. biol. hum. Torsten Kroll und dem gesamten Team des molekularbiologischen Forschungslabors der KIM II, insbesondere Frau Anja Waldau, Frau Dana Hüttig, Frau Conny Jörke, Frau Heike Wahner und Frau Dr. Manuela Schwalbe, die alle entscheidend zum Gelingen meiner Promotionsarbeit beigetragen haben.

Herzlichst möchte ich mich auch für die freundliche Unterstützung aus dem Institut für Biochemie bedanken. Durch die sehr nette und fachkundige Hilfe von Herrn Prof. Dr. med. Wiederanders, Frau Prof. Dr. Wenz, Frau Seul und Frau Kreusch wurden die Versuche mit dem Microarray überhaupt erst möglich.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die alle mitgelitten haben.

8.4 Lebenslauf

Annette Katharina Geyer

Bei der Fruchtschranne 2
72070 Tübingen
Tel.: 0176-24057484
Mail: annette.geyer@med.uni-tuebingen.de

Persönliche Daten

Geburtsort: Göttingen
Geburtsdatum: 09.05.1977
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulische Ausbildung

1996 Abitur an der Alfred-Delp-Schule in Dieburg (Note: 1,3)

Studium

1996-1997 Studium der Rechtswissenschaften an der Ludwig-Maximilian-Universität, München
1997-2004 Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität in Jena
09/1999 Physikum (Note: 2,3)
04/2001 1. Staatsexamen (Note: 3,0)
09/2002 2. Staatsexamen (Note: 2,0)
04/2004 3. Staatsexamen (Note: 2,0)

Auslandsaufenthalte

1993-1994 Einjähriger Schüleraustausch mit Youth for Understanding in Colorado, USA
1999-2000 Auslandssemester an der Université Louis Pasteur in Strasbourg, Frankreich
2003 Chirurgisches Tertial am UniversitätSpital Zürich, Schweiz
2003 Wahltertial (Dermatologie) an der UCSF in San Francisco, USA

	Promotion
seit 10/2001	Experimentelle Arbeit zum Thema „Die Wirkung des Knochenmorphogenesefaktors BMP-2 auf die Migration und Invasivität von Mammarkarzinomzellen“ im Onkologischen Forschungslabor der Klinik für Innere Medizin II der FSU Jena (Prof. Höffken)
	Wissenschaftliche Ausbildung
seit 08/2004	Wissenschaftliche Assistentin an der Universitäts Hautklinik der Eberhardt-Karls-Universität in Tübingen
	Tätigkeiten neben dem Studium
1998-2003	Mitarbeit bei der Fachschaft, Semestersprecherin 2000/2001
2000-2002	Vorsitzende der European Medical Students´ Association in Jena
2000-2003	Mitarbeit im Innovationsprogramm der FSU und am Projekt „Vision 2003“
	Weitere Kenntnisse
	Sprachen: Englisch, Französisch
	EDV: sicherer Umgang mit Microsoft Office, SPSS, SAP und dem Internet
	Hobbies: Sport (Tennis, Jogging, Schwimmen, Segeln, Skifahren) Musik (Klavier, Klarinette, Saxophon)

Tübingen, den

8.5 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich diese Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Dr. rer. biol. hum. J. Clement,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Tübingen, den